

Hugo Emanuel Pereira Pinto de Jesus Almeida

# **Aplicação de polímeros sensíveis a estímulos em sistemas de libertação modificada de fármacos para uso oftálmico**

Tese do 3º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Doutoramento em Ciências Farmacêuticas com especialização em Tecnologia Farmacêutica submetida à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Portugal

Trabalho realizado sob a orientação da Professora Doutora Maria Helena dos Anjos Rodrigues Amaral e coorientação do Professor Doutor Paulo Alexandre Lourenço Lobão

Porto  
Dezembro de 2015

É autorizada a reprodução integral desta tese apenas para efeitos de investigação,  
mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete.



## **Agradecimentos**

Desejo expressar os mais sinceros agradecimentos:

À Professora Doutora Maria Helena Amaral, orientadora desta tese, por toda a dedicação, disponibilidade e ajuda, sem a qual não seria possível o desenvolvimento e a conclusão desta tese.

Ao Professor Doutor Paulo Lobão, coorientador desta tese, pela ajuda, simpatia e confiança que me foi transmitindo ao longo destes anos.

Ao Professor Doutor José Manuel Correia Neves de Sousa Lobo pela oportunidade concedida para a realização do doutoramento no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica. Sabendo que o meu doutoramento ia ser feito em horário pós-laboral, mesmo assim, acreditou que, com esforço e dedicação, seria possível chegar a bom porto.

Ao amigo e funcionário do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Joel Fonseca, por toda a colaboração, disponibilidade e ajuda.

Ao amigo Doutor Christian Frigerio, que participou de forma ativa no desenrolar do trabalho, agradeço-lhe toda a ajuda, dedicação, empenho e espírito crítico.

À Professora Doutora Renata Silva pela ajuda prestada durante a elaboração desta tese.

A todos os restantes professores do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica que, diariamente, iam manifestando o seu apoio, confiança e carinho.

Aos meus pais por todos os ensinamentos, apoio incondicional, entusiasmo e, pelas palavras de incentivo dispensadas ao longo de toda uma vida. São, sem dúvida, um exemplo de vida e de entrega.

Ao meu irmão, pelos incentivos e carinho dispensado ao longo destes anos.

À Liliana, minha namorada, que soube compreender a necessidade de cumprir este

sonho. Aceitou a minha ausência e sempre com um sorriso no rosto ou com uma palavra amiga tentou sempre minimizar as dificuldades ou insucessos.

Aos meus restantes familiares pelo carinho e pelo apoio incondicional que sempre me dispensaram.

Aos meus grandes amigos que conheci nos tempos de Coimbra (André Lage, César Gonçalves, Edgar Fernandes, Filipe Pardal, Guilherme Gonçalves, José Rui Peixoto, Pedro Henriques, Ricardo Soares e Telmo Madeira) dedico-lhes todo este esforço.

Aos meus colegas de trabalho que ao longo destes anos souberam compreender as minhas angústias diárias dando-me aquela força ou aquele sorriso que nestas alturas são fundamentais para continuar a acreditar.

À empresa Albino Dias de Andrade, Lda agradeço o facto de me ter permitido frequentar o Doutoramento em Ciências Farmacêuticas. Espero retribuir de igual forma com os conhecimentos que adquiri.

Às empresas Gattefossé (França), Basf (Alemanha) e Cremer Oleo GmbH & Co. KG (Alemanha) por terem oferecido algumas das matérias-primas utilizadas nos trabalhos experimentais.

## Resumo

Há muitos anos que a indústria farmacêutica utiliza diferentes tipos de polímeros na preparação de formas farmacêuticas com diferentes funções. Os polímeros sensíveis a estímulos têm a capacidade de responder às variações das propriedades físico-químicas do ambiente envolvente, alterando a sua microestrutura, permitindo, por exemplo, a libertação modificada de fármacos. Os polímeros termossensíveis, os polímeros sensíveis às variações do pH e os polímeros sensíveis à força iónica são os exemplos mais comuns.

Os nanotransportadores coloidais como as nanopartículas lipídicas, em especial os vetores lipídicos nanoestruturados (NLC), são uma outra estratégia utilizada, os quais devido à sua elevada capacidade de encapsulação e biocompatibilidade, permitem vetorizar e modificar a libertação dos fármacos, aumentando exponencialmente a sua concentração no alvo terapêutico.

As formas farmacêuticas oftálmicas de aplicação tópica designadas como convencionais apresentam muitas limitações, sendo rapidamente eliminadas da superfície ocular, facto que condiciona a respetiva eficácia terapêutica. A especificidade dos tecidos oculares, os mecanismos de defesa do globo ocular (lacrimejar, pestanejar, renovação constante do fluido lacrimal, capacidade limitada do saco conjuntival e drenagem nasolacrimal) juntamente com o facto das formulações oftálmicas convencionais de aplicação tópica não apresentarem propriedades mucoadesivas, fazem com que este tipo de formulações sejam rapidamente eliminadas da zona pré-corneal.

Foi objetivo desta tese aumentar a biodisponibilidade e a eficácia terapêutica de formulações oftálmicas para administração local de ibuprofeno, aumentando o tempo de retenção da formulação na superfície ocular através do aumento da viscosidade, da bioadesividade e da capacidade de penetração através dos tecidos oculares. Assim, numa primeira fase procedeu-se à preparação e caracterização de dispersões coloidais, mais concretamente vetores lipídicos nanoestruturados (NLC) veiculando o ibuprofeno, tendo estes apresentado um diâmetro médio inferior a 200 nm, um potencial zeta positivo, uma elevada eficácia de encapsulação (superior a 80% em todas as formulações desenvolvidas) e boa estabilidade, não só ao longo do tempo de armazenamento, mas também em contacto com o fluido lacrimal artificial e na presença das principais glicoproteínas existentes nos tecidos oculares, nomeadamente a mucina e a lisozima.

Como as dispersões coloidais apresentam uma baixa viscosidade, numa segunda fase deste trabalho, procedeu-se à adição de polímeros sensíveis a estímulos para

aumentar a viscosidade e a bioadesividade destes sistemas farmacêuticos. Assim, foi adicionado à dispersão coloidal um polímero sensível à temperatura, o Pluronic® F 127 (PF-127), tendo sido adicionada numa fase posterior uma mistura de dois polímeros sensíveis a estímulos diferentes, o PF 127 e o quitosano (polímero mucoadesivo sensível ao pH) com o objetivo de aproveitar as diferentes características físico-químicas dos tecidos oculares, para que a formulação ao ser administrada sofresse imediatamente uma transição de fase sol-gel, aumentando exponencialmente o tempo de residência da formulação na superfície ocular, a biodisponibilidade e, por conseguinte, a eficácia terapêutica. Simulando as condições fisiológicas, as formulações desenvolvidas neste trabalho apresentaram temperaturas de transição de fase sol-gel inferiores a 35°C, propriedades mucoadesivas, libertação prolongada do fármaco veiculado e biocompatibilidade com os tecidos oculares, tendo esta característica sido comprovada através do ensaio de biocompatibilidade com a linha celular de retinoblastoma humano Y-79 e através do ensaio *in vitro* de irritabilidade ocular por HET-CAM.

**Palavras-chave:** Dispersões coloidais, Ibuprofeno, polímeros sensíveis a estímulos, Poloxâmeros, Vetores lipídicos nanoestruturados.

## Abstract

For many years, the pharmaceutical industry has been using several types of polymers in the preparation of pharmaceutical formulations with different functions. *Stimuli-responsive* polymers are able to respond to changes in the physicochemical properties of the surrounding environment by changing its microstructure, allowing, for example, a modified drug release. Thermosensitive polymers, pH-responsive polymers and ion-activated polymers are the most common examples.

Colloidal nanocarriers, such as lipid nanoparticles, in particular nanostructured lipid carriers (NLC), are another strategy used, which, due to its high level of encapsulation and biocompatibility, allows to deliver and modify the drug release, increasing exponentially its concentration in the therapeutic target.

The conventional topical ophthalmic pharmaceutical formulations present several limitations, being rapidly removed from the ocular surface, which restrains their respective therapeutic efficacy. The specificity of the ocular tissues, the defense mechanisms of the eye (lacrimation, blinking, constant turnover of the tear fluid, the limited capacity of the conjunctival sac and the nasolacrimal drainage) coupled with the fact that the conventional topical ophthalmic formulations does not present mucoadhesive properties, allows this kind of formulations to be rapidly removed from the precorneal area.

The goal of this thesis was to increase the bioavailability and the therapeutic efficacy of the ophthalmic formulations for local administration of ibuprofen, increasing the retention time of the formulation on the ocular surface by increasing viscosity, bioadhesiveness and the penetration capacity through the ocular tissues. Thus, in the first stage colloidal dispersions were prepared and characterized, in particular ibuprofen loaded nanostructured lipid carriers (NLC), which showed a mean diameter smaller than 200 nm, a positive zeta potential, a high encapsulation efficiency (greater than 80% in all the formulations developed), as well as good stability, not only during the storage time, but also when in contact with the artificial tear fluid and in the presence of the major glycoproteins existing in the ocular tissues, in particular mucin and lysozyme.

As colloidal dispersions present low viscosity, in the second stage of this research work, *stimuli-responsive* polymers were added to increase the viscosity and the bioadhesiveness of such pharmaceutical systems. Thus, a thermoresponsive polymer, Pluronic® F 127 (PF-127), was added to the colloidal dispersions, having been added at a later stage, a mixture of two different *stimuli-responsive* polymers, PF 127 and chitosan (mucoadhesive and pH-responsive polymer) in order to take advantage of the different physical-chemical properties of the ocular tissues, such that, when administered, the

ophthalmic formulation suffer immediately a sol-gel phase transition, increasing exponentially the formulation residence time in the ocular surface, the bioavailability and, therefore, the therapeutic efficacy of the ocular drug. Simulating the physiological conditions, the formulations developed in this work have shown a sol-gel transition temperature below 35°C, mucoadhesive properties, sustained drug release and biocompatibility with ocular tissue, having this characteristic been proven through a biocompatibility assay using Y-79 human retinoblastoma cell line and through the *in vitro* ocular irritation testing using the HET-CAM assay.

**Keywords:** Colloidal dispersions, Ibuprofen, Hydrogels, Poloxamers, Nanostructured lipid carriers.

## Estrutura e organização da tese

Esta dissertação está dividida em 7 capítulos, estando cada um destes subdividido em vários subcapítulos.

O **capítulo 1** corresponde à parte introdutória. Neste capítulo é feita uma revisão teórica de todos os conceitos abordados na tese, definindo e explicando os mecanismos de atuação dos polímeros sensíveis a estímulos, abordando também a temática dos transportadores coloidais, nomeadamente as nanopartículas lipídicas. Este capítulo finaliza justificando a escolha deste tipo de estratégias em formulações farmacêuticas para administração oftálmica.

No **capítulo 2** são descritos, não só os materiais e equipamentos utilizados no decorrer do trabalho experimental, assim como todos os métodos e técnicas analíticas utilizadas para a preparação e caracterização dos hidrogéis e das nanopartículas lipídicas.

No **capítulo 3** descreve-se a preparação e caracterização dos diferentes hidrogéis preparados com poloxâmeros (polímeros termossensíveis), contendo ibuprofeno ou hidrocortisona, para a aplicação na derme, analisando a influência de diferentes variáveis, como o tipo e a concentração do poloxâmero utilizado, o tipo de fármaco, a temperatura e o tempo de armazenamento no comportamento deste tipo de hidrogéis. Esta primeira parte do trabalho experimental teve como objetivo primordial proporcionar um primeiro contacto com os polímeros sensíveis a estímulos.

Nos **capítulos 4 e 5** é descrito o desenvolvimento de vetores lipídicos nanoestruturados (NLC), tendo sido incorporado nesta dispersão coloidal um polímero termossensível, o Pluronic® F 127, com o objetivo de aumentar o tempo de residência da formulação na região pré-corneal, através do aumento da viscosidade, somente quando entra em contacto com a temperatura da superfície ocular. É descrita não só a caracterização das diferentes NLC preparadas (tamanho das partículas, índice de polidispersão, potencial zeta, eficácia de encapsulação, determinação da morfologia, estabilidade ótica por Turbiscan), como também a caracterização das formulações finais (osmolalidade, determinação da temperatura de transição sol-gel, textura, viscosidade, ensaios de biocompatibilidade usando a linha celular Y-79, ensaio *in vitro* de irritabilidade ocular por HET-CAM e ensaios de libertação/dissolução *in vitro*).

No **capítulo 6** descreve-se a preparação de NLC, tendo sido adicionado dois polímeros sensíveis a estímulos distintos, nomeadamente, o quitosano (polímero mucoadesivo sensível ao pH) e o Pluronic® F 127 (polímero termossensível). A adição em simultâneo de polímeros sensíveis a estímulos distintos na mesma formulação teve como

objetivo aumentar a biodisponibilidade da formulação oftálmica, aproveitando as propriedades físico-químicas únicas do tecido ocular. Foi efetuada, não só a caracterização das diferentes NLC preparadas como também a caracterização das formulações finais obtidas após a adição dos polímeros sensíveis a estímulos.

O **capítulo 7** apresenta as principais conclusões do trabalho experimental desenvolvido, abordando também as perspectivas futuras das estratégias utilizadas.



## Trabalhos publicados

A maioria da informação contida nesta tese de doutoramento foi previamente publicada ou submetida para publicação em revistas científicas internacionais com arbitragem científica descritas na seguinte lista:

**Almeida H**, Lobão P, Frigerio C, Fonseca J, Silva R, Quaresma P, Sousa Lobo JM, Amaral MH. Mucoadhesive and thermoresponsive eyedrops containing nanostructured lipid carriers (NLC) for controlled delivery of ibuprofen: Preparation, characterization and biocompatibility studies. (Artigo submetido para publicação)

**Almeida H**, Lobão P, Frigerio C, Fonseca J, Silva R, Quaresma P, Sousa Lobo JM, Amaral MH. Preparation, characterization and biocompatibility studies of thermoresponsive eyedrops based on the combination of nanostructured lipid carriers (NLC) and the polymer Pluronic® F-127 for controlled delivery of ibuprofen. *Pharm Dev Technol.* (Artigo aceite para publicação)

**Almeida H**, Lobão P, Frigerio C, Fonseca J, Silva R, Palmeira-de-Oliveira A, Sousa Lobo JM, Amaral MH. New thermoresponsive eyedrop formulation containing ibuprofen loaded-Nanostructured Lipid Carriers (NLC): development, characterization and biocompatibility studies. *Curr Drug Deliv.* (Artigo aceite para publicação)

**Almeida H**, Amaral MH, Lobão P, Frigerio C, Sousa Lobo JM. Nanoparticles in Ocular Drug Delivery Systems for Topical Administration: Promises and Challenges. *Curr Pharm Des* 2015 Nov; 21(36):5212-5224.

**Almeida H**, Amaral MH, Lobão P, Silva AC, Sousa Lobo JM. Applications of lipid and polymeric nanoparticles in ophthalmic pharmaceutical formulations: present and futures considerations. *J Pharm Pharm Sci* 2014 Jul; 17(3):278-293.

**Almeida H**, Amaral MH, Lobão P, Sousa Lobo JM. *In situ* gelling systems: a strategy to improve the bioavailability of ophthalmic pharmaceutical formulations. *Drug Discov Today* 2014 Apr; 19(4): 400-412.

**Almeida H**, Amaral MH, Lobão P, Sousa Lobo JM. Applications of Poloxamers in Ophthalmic Pharmaceutical Formulations: An Overview. *Expet Opin Drug Deliv* 2013 Sep; 10(9): 1223-1237.

**Almeida H**, Amaral MH, Lobão P, Sousa Lobo JM. Influence of drug incorporation, temperature and storage time on the pH, textural and rheological properties of different poloxamer hydrogels. *Curr Drug Deliv* 2013 Dec; 10(6):753-764.

**Almeida H**, Amaral MH, Lobão P, Sousa Lobo JM. Pluronic® F-127 and Pluronic Lecithin Organogel (PLO): Main features and their applications in topical and transdermal administration of drugs. *J Pharm Pharm Sci* 2012 Oct; 15(4): 592-605.

**Almeida H**, Amaral MH, Lobão P. Temperature and pH stimuli-responsive polymers and their applications in controlled and self-regulated drug delivery. *J App Pharm Sci* 2012 Jun; 2(6): 01-10.

#### **Comunicações orais**

**Almeida H**. "Polímeros Inteligentes utilizados na administração de proteínas e ácidos nucleicos". Apresentado no 4º Encontro de Biotecnologia Microbiana e Farmacêutica, no Porto, em 29 de Abril de 2015.

#### **Comunicações apresentadas sob a forma de painel (poster)**

**Almeida H**, Amaral MH, Lobão P, Sousa Lobo JM. "Influence of the incorporation of drugs into various characteristics of hydrogels containing different concentrations of poloxamer LF-127". Apresentado no 9<sup>th</sup> World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, organizado pela ADRITELF, APV e pela APGI, em Lisboa, de 31 de Março a 3 de Abril de 2014.

**Almeida H**, Amaral MH, Lobão P, Sousa Lobo JM. "Polímeros inteligentes – importância da sua utilização em formas de libertação modificada". Apresentado no Congresso Nacional dos Farmacêuticos 2012 intitulado "Mais Intervenção na Sociedade Melhor

Saúde”, organizado pela Ordem dos Farmacêuticos, em Lisboa, de 2 a 4 de Novembro de 2012.

## **Índice sistemático**

<b>Declaração</b>	iv
<b>Agradecimentos</b>	v
<b>Resumo</b>	vii
<b>Abstract</b>	ix
<b>Estrutura e organização da tese</b>	xi
<b>Trabalhos publicados</b>	xiii
<b>Índice sistemático</b>	xvi
<b>Índice de figuras</b>	xxiii
<b>Índice de tabelas</b>	xxxiii
<b>Lista de abreviaturas e símbolos</b>	xxxvi

<b>1. Introdução</b>	1
1.1 Formas Farmacêuticas de Liberação Modificada	1
1.2 Formas Farmacêuticas para Aplicação Ocular	4
1.2.1 Anatomia e fisiologia do sistema ocular	6
1.2.2 Composição do fluido lacrimal	7
1.2.3 Limitações fisiológicas e farmacocinéticas da administração ocular	8
1.2.4 Estratégias para aumentar a biodisponibilidade de formulações oftálmicas	10
1.2.4.1 Aumento da retenção através do veículo	11
1.2.4.1.1 Hidrogéis poliméricos	12
1.2.4.1.2 Polímeros sensíveis a estímulos	14
1.2.4.1.2.1 Estímulos que interatuam com os polímeros sensíveis a estímulos	16
1.2.4.1.2.2 Classificação dos polímeros sensíveis a estímulos	16
1.2.4.1.2.3 Polímeros termossensíveis	17
1.2.4.1.2.4 Polímeros sensíveis ao pH	20
1.2.4.1.2.5 Polímeros sensíveis à força iônica	24
1.2.4.1.2.6 Sistemas poliméricos sensíveis a mais do que um estímulo	25
1.2.4.1.2.7 Polímeros sensíveis a estímulos utilizados em formas farmacêuticas para uso oftálmico	26
1.2.4.1.2.7.1 Polímeros termossensíveis	27
1.2.4.1.2.7.1.1 Poloxâmeros	28
1.2.4.1.2.7.1.2 Características gerais e propriedades dos poloxâmeros	28

1.2.4.1.2.7.1.3 Pluronic® F-127	29
1.2.4.1.2.7.2 Polímeros sensíveis ao pH	34
1.2.4.1.2.7.2.1 Quitosano	36
1.2.4.1.2.7.3 Formulações oftálmicas preparadas com dois ou mais polímeros sensíveis a estímulos	37
1.2.4.1.3 Transportadores coloidais – considerações gerais	40
1.2.4.1.3.1 Nanopartículas poliméricas	42
1.2.4.1.3.2 Nanopartículas lipídicas	45
1.2.4.1.3.2.1 Modelos de incorporação de fármacos em SLN	47
1.2.4.1.3.2.2 Modelos de incorporação de fármacos em NLC	48
1.2.4.1.3.2.3 Métodos de preparação das nanopartículas lipídicas	49
1.2.4.1.3.2.4 Desvantagens associadas às nanopartículas lipídicas	52
1.2.4.1.3.2.5 Exemplos da utilização de nanopartículas lipídicas em formulações oftálmicas tópicas	53
1.2.4.1.3.2.6 Desenvolvimento de formulações oftálmicas usando uma combinação de nanopartículas e polímeros sensíveis a estímulos	55
1.2.4.1.3.2.7 Aspectos críticos a considerar no desenvolvimento de formulações baseadas na combinação de nanopartículas com polímeros sensíveis a estímulos	57
<b>2. Materiais e métodos</b>	58
2.1 Matérias-primas e reagentes	58
2.2 Equipamento	59
2.3 Métodos	60
2.3.1 Estudo de compatibilidade e solubilidade lipídica	60
2.3.2 Preparação das nanopartículas lipídicas (vetores lipídicos nanoestruturados (NLC))	61
2.3.3 Preparação dos hidrogéis	63
2.3.3.1 Preparação dos hidrogéis de LF-127 e LF-108 de aplicação dérmica	63
2.3.3.2 Preparação dos hidrogéis de PF 127 de aplicação oftálmica	64
2.3.3.3 Preparação dos hidrogéis de quitosano	65
2.3.3.4 Preparação dos hidrogéis de PF e quitosano contendo NLC	66
2.3.4 Caracterização das dispersões coloidais	68
2.3.4.1 Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão e do potencial zeta	68
2.3.4.2 Determinação da morfologia das nanopartículas por microscopia	70

eletrônica de varrimento de alta resolução a baixa temperatura (cryoSEM)	
2.3.4.3 Análise térmica por calorimetria diferencial de varrimento (DSC)	71
2.3.4.4 Determinação da eficácia de encapsulação e da capacidade de carga dos NLC	72
2.3.4.4.1 Doseamento do fármaco por espectrofotometria UV-VIS	73
2.3.4.5 Avaliação da estabilidade ótica das dispersões coloidais (Turbiscan LAB Expert®)	77
2.3.4.6 Avaliação da estabilidade das dispersões de NLC ao longo do tempo de armazenamento	79
2.3.4.7 Avaliação da estabilidade das dispersões de NLC na presença de fluido lacrimal artificial e na presença de fluido lacrimal artificial com mucina ou lisozima	79
2.3.4.8 Determinação do pH	80
2.3.4.9 Determinação da osmolalidade	80
2.3.4.10 Determinação da temperatura de transição de fase solução-gel	82
2.3.4.11 Análise dos parâmetros de textura	82
2.3.4.12 Análise reológica	84
2.3.4.13 Estudos de mucoadesão na presença de fluido lacrimal artificial com mucina	88
2.3.4.13.1 Análise reológica das formulações diluídas em fluido lacrimal artificial contendo mucina	88
2.3.4.13.2 Determinação da força e do trabalho de adesão	89
2.3.4.14 Estudos de Biocompatibilidade: Ensaio da redução do Alamar Blue	90
2.3.4.15 Ensaio <i>in vitro</i> da irritabilidade ocular: HET-CAM	91
2.3.4.16 Ensaios de liberação/dissolução <i>in vitro</i>	93
2.3.4.16.1 Formulações de aplicação cutânea	94
2.3.4.16.2 Formulações de aplicação oftálmica	94
2.3.4.16.3 Doseamento do fármaco por espectrofotometria UV-VIS	96
<b>3. Influência da incorporação de fármacos, da temperatura e do tempo de armazenamento no pH, na textura, nas propriedades reológicas e no perfil de liberação do fármaco incorporado em diferentes hidrogéis preparados com poloxâmeros</b>	<b>99</b>
3.1 Introdução	99
3.2 Materiais e Métodos	100
3.3 Resultados e Discussão	101

3.3.1 Determinação do pH	101
3.3.2 Análise dos parâmetros da textura	103
3.3.3 Análises reológicas	107
3.3.4 Ensaios de libertação/dissolução <i>in vitro</i>	112
3.3.4.1 Validação do método de doseamento do ibuprofeno	112
3.3.4.2 Validação do método de doseamento da hidrocortisona	115
3.3.4.3 Resultados do ensaio de libertação/dissolução <i>in vitro</i>	118
3.4 Conclusões	120
<b>4. Desenvolvimento de um colírio baseado na associação de NLC contendo Compritol® ATO 888 e Miglyol® 812 com o polímero termossensível Pluronic® F 127</b>	122
4.1 Introdução	122
4.2 Materiais e Métodos	123
4.3 Resultados e Discussão	124
4.3.1 Estudo de compatibilidade e solubilidade lipídica	124
4.3.2 Caracterização das dispersões coloidais	125
4.3.2.1 Determinação e correção do pH e da osmolalidade	125
4.3.2.2 Determinação da temperatura de transição de fase solução-gel	126
4.3.2.3 Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão e do potencial zeta	128
4.3.2.4 Avaliação da estabilidade das dispersões lipídicas na presença de fluido lacrimal artificial	131
4.3.2.5 Determinação da morfologia das nanopartículas por microscopia eletrónica de varrimento de alta resolução a baixa temperatura (cryoSEM)	133
4.3.2.6 Avaliação da estabilidade ótica das dispersões coloidais (Turbiscan LAB Expert®)	133
4.3.2.7 Determinação da eficácia de encapsulação e da capacidade de carga dos NLC	136
4.3.2.7.1 Validação do método de doseamento do ibuprofeno	136
4.3.2.7.2 Resultados da eficácia de encapsulação e da capacidade de carga dos NLC	139
4.3.2.8 Análise térmica por calorimetria diferencial de varrimento (DSC)	140
4.3.2.9 Análise dos parâmetros de textura antes e após a diluição em fluido lacrimal artificial	142
4.3.2.10 Análise reológica antes e após a diluição em fluido lacrimal artificial	144

4.3.2.11 Estudos de biocompatibilidade: Ensaio da redução do Alamar Blue	145
4.3.2.12 Ensaio de liberação/dissolução <i>in vitro</i>	147
4.3.2.12.1 Validação do método de doseamento do ibuprofeno em solução tampão fosfato pH 7,4	147
4.3.2.12.2 Validação do método de doseamento do ibuprofeno em fluido lacrimal artificial (STF) pH 7,4	147
4.3.2.12.3 Resultados do ensaio de liberação/dissolução <i>in vitro</i>	150
4.4 Conclusões	153
<b>5. Desenvolvimento, caracterização e estudos de biocompatibilidade de um colírio termossensível contendo Vetores Lipídicos Nanoestruturados (NLC) para a liberação prolongada do ibuprofeno</b>	154
5.1 Introdução	154
5.2 Materiais e Métodos	154
5.3 Resultados e Discussão	155
5.3.1 Estudo de compatibilidade e solubilidade lipídica	155
5.3.2 Caracterização das dispersões coloidais	156
5.3.2.1 Avaliação do aspeto físico	156
5.3.2.2 Determinação e correção do pH e da osmolalidade	158
5.3.2.3 Determinação da temperatura de transição de fase solução-gel	159
5.3.2.4 Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão e do potencial zeta	160
5.3.2.5 Avaliação da estabilidade das dispersões lipídicas na presença de fluido lacrimal artificial	164
5.3.2.6 Determinação da morfologia das nanopartículas por microscopia eletrónica de varrimento de alta resolução a baixa temperatura (cryoSEM)	166
5.3.2.7 Determinação da eficácia de encapsulação e da capacidade de carga das NLC	166
5.3.2.7.1 Validação do método de doseamento do ibuprofeno	166
5.3.2.7.2 Resultados da eficácia de encapsulação e da capacidade de carga das NLC	167
5.3.2.8 Análise térmica por calorimetria diferencial de varrimento (DSC)	167
5.3.2.9 Análise dos parâmetros de textura antes e após a diluição em fluido lacrimal artificial	169
5.3.2.10 Análise reológica antes e após a diluição em fluido lacrimal artificial	172
5.3.2.11 Estudos de biocompatibilidade: Ensaio da redução do Alamar Blue	174



5.3.2.12 Ensaio <i>in vitro</i> da irritabilidade ocular: Ensaio de HET-CAM	176
5.3.2.13 Ensaios de libertação/dissolução <i>in vitro</i>	180
5.3.2.13.1 Validação do método de doseamento do ibuprofeno	180
5.3.2.13.2 Resultados do ensaio de libertação/dissolução <i>in vitro</i>	180
5.4 Conclusões	181
<b>6. Preparação e caracterização de um colírio termossensível com propriedades mucoadesivas contendo NLC para a libertação modificada de ibuprofeno</b>	183
6.1 Introdução	183
6.2 Materiais e Métodos	184
6.3 Resultados e Discussão	184
6.3.1 Estudo de compatibilidade e solubilidade lipídica	184
6.3.2 Caracterização físico-química das dispersões coloidais	186
6.3.2.1 Determinação da quantidade de polímero PF 127 a adicionar à dispersão coloidal	186
6.3.2.2 Análise térmica por calorimetria diferencial de varrimento (DSC)	187
6.3.2.3 Efeito da adição de diferentes agentes isotonzantes no aspecto físico, na viscosidade e nas propriedades físico-químicas dos NLC	189
6.3.2.4 Avaliação do aspeto físico e da osmolalidade	194
6.3.2.5 Determinação da temperatura de transição de fase solução-gel	195
6.3.2.6 Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão e do potencial zeta	196
6.3.2.7 Determinação da morfologia das nanopartículas por microscopia eletrónica de varrimento de alta resolução a baixa temperatura (cryoSEM)	199
6.3.2.8 Determinação da eficácia de encapsulação e da capacidade de carga das NLC	200
6.3.2.8.1 Validação do método de doseamento do ibuprofeno	200
6.3.2.8.2 Resultados da eficácia de encapsulação e da capacidade de carga das NLC	203
6.3.2.9 Análise dos parâmetros de textura antes e após a diluição em fluido lacrimal artificial	203
6.3.2.10 Análise reológica antes e após a diluição em fluido lacrimal artificial	205
6.3.2.11 Estudos da interação com a lisozima e mucina	207
6.3.2.11.1 Avaliação da estabilidade das dispersões coloidais na presença de fluido lacrimal artificial e na presença de fluido lacrimal artificial com mucina	207

ou lisozima	
6.3.2.11.2 Estudos de mucoadesão na presença de fluido lacrimal artificial com mucina	209
6.3.2.11.2.1 Análise reológica das formulações diluídas em fluido lacrimal artificial contendo mucina	209
6.3.2.11.2.2 Determinação da força e do trabalho de adesão	211
6.3.2.12 Estudos de biocompatibilidade: Ensaio da redução do Alamar Blue	213
6.3.2.13 Ensaios de dissolução/dissolução <i>in vitro</i>	220
6.3.2.13.1 Validação do método de doseamento do ibuprofeno	220
6.3.2.13.2 Resultados do ensaio de libertação/dissolução <i>in vitro</i>	220
6.4 Conclusão	221
<b>7. Conclusões finais e perspectivas futuras</b>	223
<b>Referências Bibliográficas</b>	227

## Índice de figuras

### Capítulo 1

- Figura 1.** Comparação entre os níveis plasmáticos de um fármaco administrado através de uma forma farmacêutica convencional e através de uma forma de libertação modificada (adaptado com permissão de Bajpai *et al.* 2008 [8]). 2
- Figura 2.** Estrutura do globo ocular (adaptado com a permissão da Sociedade Canadiana do Cancro). 6
- Figura 3.** Alterações físico-químicas na estrutura da rede polimérica quando na presença de um estímulo específico (adaptado com permissão de Bajpai *et al.* 2008 [8]). 15
- Figura 4.** Estrutura química do Pluronic® F-127. 29
- Figura 5.** Modelos teóricos representativos dos diferentes tipos de SLN ilustrando a localização do fármaco na matriz lipídica sólida. (a) SLN tipo I; (b) SLN tipo II; (c) SLN tipo III. (adaptado com permissão de Souto *et al.* 2007 [325]). 47
- Figura 6.** Modelos teóricos representativos dos três tipos NLC. (a) NLC tipo I; (b) NLC tipo II; (c) NLC tipo III (adaptado com permissão de Souto *et al.*, 2007 [325]). 48
- Figura 7.** Representação esquemática das NLC dispersas na rede polimérica de um hidrogel (adaptado com permissão de Doktorovova e Souto, (2009) [314], disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17425240802712590#abstract>). 56

### Capítulo 2

- Figura 8.** Ilustração dos equipamentos necessários para a preparação dos NLC, o Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel IKA® Labortechnik, Germany) e a sonda de sonicação (Vibra Cell™ VCX 130 Model CV 18, USA). 62
- Figura 9.** Aspeto final da dispersão coloidal NLC contendo 0,1% (m/m) de Ibuprofeno. 62
- Figura 10.** Preparação dos hidrogéis de poloxâmero pelo método a frio. 63
- Figura 11.** Incorporação do fármaco e do Nipagin no hidrogel de poloxâmero recorrendo ao Unguator® (Ruhrwerks, Alemanha). 64
- Figura 12.** Aspeto final do hidrogel de LF 108 20% (m/m) com ibuprofeno 5% 64

(m/m).

<b>Figura 13.</b> Aspetto final do hidrogel oftálmico preparado com o PF 127 15% (m/m) e 0,1% (m/m) de ibuprofeno.	65
<b>Figura 14.</b> Aspetto final do hidrogel de quitosano 1% (m/m) preparado em ácido acético glacial 0,5% (m/m).	66
<b>Figura 15.</b> Aspetto final dos NLC com 0,1% (m/m) de ibuprofeno contendo PF 127 15% (m/m).	67
<b>Figura 16.</b> Aspetto final dos hidrogéis NLC-CS (A) e NLC-CS+PF127 (B).	68
<b>Figura 17.</b> Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Reino Unido).	69
<b>Figura 18.</b> Calorimetria diferencial de varrimento (DSC) - Netzsch DSC 200 F3 Maia® (Alemanha).	72
<b>Figura 19.</b> Espectrofotômetro UV-VIS JASCO V-650 (Japão).	74
<b>Figura 20.</b> Turbiscan LAB Expert® (França) usado para a avaliar a estabilidade ótica das dispersões coloidais.	78
<b>Figura 21.</b> Osmómetro Micro-Osmometer Automatic Type 15 (Alemanha).	81
<b>Figura 22.</b> Representação de um gráfico força <i>versus</i> distância.	83
<b>Figura 23.</b> Texturómetro Stable Micro Systems TA-XT2i (Reino Unido).	84
<b>Figura 24.</b> Reograma exemplificando alguns comportamentos reológicos dos fluidos não-Newtonianos (adaptado de Oliveira, 2009 [374]).	86
<b>Figura 25.</b> Viscosímetro rotacional Thermo Haake VT-550 tipo Searle (Alemanha).	87
<b>Figura 26.</b> Texturómetro TA-XT2i Texture Analyzer equipamento com um dispositivo para avaliar a mucoadesão A/MUC.	89
<b>Figura 27.</b> Aparelho para realização do ensaio de dissolução SOTAX AT7 (Suíça).	94

### Capítulo 3

<b>Figura 28.</b> Valores de pH dos hidrogéis de LF127 e LF-108, durante o tempo de armazenamento de 8, 30 e 60 dias.	101
<b>Figura 29.</b> Ensaio de textura com a sonda cilíndrica de 13 mm.	103
<b>Figura 30.</b> Firmeza (F <sub>máx</sub> ) (A) e Adesividade (Área Negativa) (B) dos hidrogéis de LF-127 e LF-108 determinadas a uma temperatura de 35±2°C, ao fim de 8, 30 e 60 dias de armazenamento.	104
<b>Figura 31.</b> Comparação entre os valores de firmeza (A) e adesividade (B) dos hidrogéis de LF127 e LF-108 20% (m/m) avaliadas a 35±2°C com os valores	106

de firmeza **(C)** e adesividade **(D)** dos hidrogéis de LF127 e LF-108 20% (m/m) avaliados a  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

**Figura 32.** Pormenor do ensaio de viscosidade utilizando um viscosímetro rotativo de cilindros concêntricos Thermo Haake VT-550 (Alemanha). 107

**Figura 33.** Reogramas dos hidrogéis de LF-127 e LF-108 20% (m/m) contendo ibuprofeno ou hidroclotisona realizados a  $35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , ao fim de 8, 30 e 60 dias de armazenamento. 108

**Figura 34.** Comparação entre os reogramas dos hidrogéis LF-127 e LF-108 obtidos a  $30\pm 0,5$  **(A)** e a  $35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  **(B)**. 110

**Figura 35.** Reogramas dos hidrogéis preparados com 20 e 30% (m/m) de LF-127 realizados a  $35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  ao fim de 8 dias após a preparação. 111

**Figura 36.** Representação da reta de calibração relativa ao estudo da linearidade da resposta do detetor do método de doseamento espectrofotométrico do ibuprofeno. 113

**Figura 37.** Representação gráfica do estudo de linearidade da resposta do detetor do método de doseamento espectrofotométrico da hidroclotisona. 116

**Figura 38.** Perfis de dissolução dos diferentes hidrogéis LF-127 e LF-108 contendo ibuprofeno **(A)** e hidroclotisona **(B)**. 119

## Capítulo 4

**Figura 39.** Aspeto final das dispersões de NLC preparadas com Compritol<sup>®</sup> ATO 888 e Miglyol<sup>®</sup> 812. 125

**Figura 40.** Valores de pH das diferentes dispersões NLC<sub>i</sub> preparadas com diferentes percentagens de PF 127, depois da sua preparação e após o ajustamento do valor de pH (Média  $\pm$  DP, n=3). 126

**Figura 41.** Valores de Z-ave, Índice de Polidispersão (PI) e Potencial Zeta (ZP) das diferentes dispersões NLC<sub>i</sub> medidos 8 e 90 dias após a sua preparação. Os diferentes resultados foram expressos como média  $\pm$  DP, realizados em triplicado. As comparações estatísticas foram efetuadas recorrendo ao Two-way ANOVA, seguido do *Tukey's multiple comparisons test* [**Z-ave** - \* $p < 0.05$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$  vs. NLC<sub>i</sub> 8 dias; \$\$\$ $p < 0.001$ ; \$\$\$\$ $p < 0.0001$  vs. NLC<sub>i</sub> (Final) 8 dias; •• $p < 0.01$ ; ••• $p < 0.0001$  Formulação 8 dias vs. Formulação (Final) 8 dias; ##### $p < 0.0001$  8 dias vs. 90 dias; **PI** - • $p < 0.05$ ; ••• $p < 0.0001$  Formulação 8 dias vs. Formulação (Final) 8 dias; ##### $p < 0.0001$  8 dias vs. 90 dias; **ZP** - \*\*\*\* $p < 0.0001$  vs. NLC<sub>i</sub> 8 dias; \$\$\$ $p < 0.0001$  vs. NLC<sub>i</sub> 129

(Final) 8 dias; \*\*\*\* $p < 0.0001$  Formulação 8 dias vs. Formulação (Final) 8 dias; # $p < 0.05$ ; ## $p < 0.01$ ; #### $p < 0.0001$  8 dias vs.90 dias].

**Figura 42.** Efeito da adição de fluido lacrimal artificial (STF) na proporção de 40:7 nos valores de Z-ave, Índice de Polidispersão (PI) e Potencial Zeta (ZP) das diferentes dispersões NLC<sub>i</sub> medidos 8 e 90 dias após a sua preparação. Os diferentes resultados foram expressos como média  $\pm$  DP, realizados em triplicado. As comparações estatísticas foram efetuadas recorrendo ao Two-way ANOVA, seguido do *Tukey's multiple comparisons test* [**Z-ave** - \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$  vs. NLC<sub>i</sub> (Final) 8 dias; \$\$\$\$ $p < 0.0001$  vs. NLC<sub>i</sub> (Final) 40:7 STF 8 dias; •• $p < 0.01$ ; ••• $p < 0.0001$  Formulação (Final) 8 dias vs. Formulação (Final) 40:7 STF 8 dias; #### $p < 0.0001$  8 dias vs.90 dias; **PI** - \$ $p < 0.05$ ; \$\$ $p < 0.01$ ; \$\$\$ $p < 0.0001$  vs. NLC<sub>i</sub> (Final) 40:7 STF 8 dias; ### $p < 0.001$ ; #### $p < 0.0001$  8 dias vs.90 dias; **ZP** - \*\*\*\*  $p < 0.0001$  vs. NLC<sub>i</sub> (Final) 8 dias; \$\$\$\$ $p < 0.0001$  vs. NLC<sub>i</sub> (Final) 40:7 STF 8 dias; •• $p < 0.001$ ; ••• $p < 0.0001$  Formulação (Final) 8 dias vs. Formulação (Final) 40:7 STF 8 dias; ## $p < 0.01$ ; ### $p < 0.001$ ; #### $p < 0.0001$  8 dias vs.90 dias].

**Figura 43.** Imagens de CryoSEM das dispersões NLC<sub>i</sub> (ampliação de 40000x).

**Figura 44.** Perfis de BS em função da altura da amostra (mm), realizados a duas temperaturas, 4°C (**A**) e 25°C (**B**); perfis de BS em função do tempo (dias) (**C**) e perfis de TSI em função do tempo (dias) (**D**) da dispersão NLC<sub>i</sub>-PF127 15% realizados em diferentes dias após a sua produção (0, 7, 15, 30 dias).

**Figura 45.** Representação gráfica da reta de calibração relativa ao estudo da linearidade da resposta do detetor do método de doseamento espectrofotométrico do ibuprofeno.

**Figura 46.** Perfis de análise térmica por DSC: (**A**) Termogramas do ibuprofeno, do lípido sólido, do polímero PF 127 e da mistura física da matriz lipídica com o ibuprofeno. (**B**) Termogramas da dispersão de NLC placebo (NLC<sub>p</sub>), da dispersão de NLC com IBU (NLC<sub>i</sub>), da dispersão de NLC sem ibuprofeno mas com PF 127 15% (m/m) (NLC<sub>p</sub>-PF 127 15%) e da dispersão NLC com ibuprofeno mas com PF 127 15% (m/m) (NLC<sub>i</sub>-PF 127 15%).

**Figura 47.** Firmeza (F<sub>máx.</sub>) (**A**) e Adesividade (Área Negativa) (**B**) da dispersão NLC<sub>i</sub>-PF 127 com diferentes concentrações de polímero termossensível com e sem diluição em STF à temperatura de 25 $\pm$ 2°C e 35 $\pm$ 2°C (Média  $\pm$  DP, n=3).

**Figura 48.** Reogramas das dispersões NLC<sub>i</sub>-PF 127 com diferentes

percentagens de polímero termossensível com e sem diluição em STF a uma temperatura de  $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ .

**Figura 49.** Efeito da adição das diferentes dispersões NLC na viabilidade celular. **(A)** NLC<sub>p</sub> – NLC placebo; **(B)** NLC<sub>i</sub> – NLC encapsulando o ibuprofeno; **(C)** NLC<sub>p</sub>-PF 127 15% - NLC placebo com PF 127 15% (m/m); **(D)** NLC<sub>i</sub>-PF 127 15% - NLC encapsulando o ibuprofeno com PF 127 15% (m/m). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  DP de 4 experiências independentes (sendo que cada experiência foi efetuada pelo menos em triplicado), e expressos como percentagem de redução do reagente Alamar Blue relativamente às células de controlo [redução do Alamar Blue (% do controlo)]. As comparações estatísticas entre os grupos foram efetuadas recorrendo ao Two-way ANOVA, seguido do *Bonferroni's multiple comparisons post hoc test* [\*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$  concentração vs. controlo (0  $\mu\text{g/mL}$ ); \$\$ $p < 0,01$ , \$\$\$ $p < 0,0001$  72 h vs. 48 h ou 24 h, para a concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ ; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ####  $p < 0,0001$  72 h vs. 48 h ou 24 h, para a concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ ].

146

**Figura 50.** Representação gráfica da reta de calibração relativa ao estudo da linearidade da resposta do detetor do método de doseamento espectrofotométrico do ibuprofeno.

148

**Figura 51.** Perfis de libertação *in vitro* do ibuprofeno a partir das formulações: HG<sub>i</sub>-PF 127 15% (m/m), NLC<sub>i</sub> e NLC<sub>i</sub>-PF 127 15% (m/m) em solução tampão fosfato a pH 7,4 **(A)** e em STF pH 7,4 **(B)**.

151

## Capítulo 5

**Figura 52.** Aspeto final das dispersões coloidais após a adição do polímero termossensível PF 127.

157

**Figura 53.** Valores de pH dos diferentes hidrogéis e das dispersões NLC<sub>i</sub> preparadas com diferentes percentagens de PF 127, depois da sua preparação e depois do ajustamento do valor de pH (Média  $\pm$  DP,  $n=3$ ).

158

**Figura 54.** Valores de Z-ave, Índice de Polidispersão (PI) e Potencial Zeta (ZP) das diferentes dispersões NLC<sub>i</sub> medidos 8 e 90 dias após a sua preparação. Os diferentes resultados foram expressos como média  $\pm$  DP, realizados em triplicado. As comparações estatísticas foram efetuadas recorrendo ao Two-way ANOVA, seguido do *Tukey's multiple comparisons test* [**Z-ave** - # $p < 0,05$  8 dias vs. 90 dias; **PI** - \$\$ $p < 0,01$ ; \$\$\$ $p < 0,0001$  vs. NLC<sub>i</sub>

161

(Final) 8 dias;  $###p<0.001$  8 dias vs.90 dias; **ZP** -  $****p<0.0001$  vs. NLCi 8 dias;  $$$$$p<0.0001$  vs. NLCi (Final) 8 dias;  $***p<0.0001$  Formulação 8 dias vs. Formulação (Final) 8 dias;  $####p<0.0001$  8 dias vs.90 dias].

**Figura 55.** Efeito da adição de fluido lacrimal artificial (STF) na proporção de 40:7 nos valores de Z-ave, Índice de Polidispersão (PI) e Potencial Zeta (ZP) das diferentes dispersões NLC<sub>i</sub> medidos 8 e 90 dias após a sua preparação. Os diferentes resultados foram expressos como média  $\pm$  DP, realizados em triplicado. As comparações estatísticas foram efetuadas recorrendo ao Two-way ANOVA, seguido do *Tukey's multiple comparisons test* [**Z-ave** -  $$$$p<0.001$ ;  $$$$$p<0.0001$  vs. NLCi (Final) 40:7 STF 8 dias;  $##p<0.01$  8 dias vs.90 dias; **PI** -  $***p<0.001$ ;  $****p<0.0001$  vs. NLCi (Final) 8 dias;  $\$p<0.05$ ;  $$$$$p<0.0001$  vs. NLCi (Final) 40:7 STF 8 dias;  $\bullet p<0.05$  Formulação (Final) 8 dias vs. Formulação (Final) 40:7 STF 8 dias; **ZP** -  $****p<0.0001$  vs. NLCi (Final) 8 dias;  $$$$$p<0.0001$  vs. NLCi (Final) 40:7 STF 8 dias;  $***p<0.0001$  Formulação (Final) 8 dias vs. Formulação (Final) 40:7 STF 8 dias;  $####p<0.0001$  8 dias vs.90 dias].

**Figura 56.** Imagens de CryoSEM das dispersões NLC<sub>i</sub> (ampliação de 40000x).

**Figura 57.** Perfis de análise térmica por DSC: **(A)** Termogramas do ibuprofeno, do lípido sólido, do PF 127 e da mistura física da matriz lipídica com o ibuprofeno. **(B)** Termogramas da dispersão de NLC sem ibuprofeno (NLC<sub>p</sub>), da dispersão de NLC com ibuprofeno (NLC<sub>i</sub>), da dispersão de NLC sem ibuprofeno e PF 127 15% (m/m) (NLC<sub>p</sub>-PF127 15%) e da dispersão de NLC com ibuprofeno e PF 127 15% (m/m) (NLC<sub>i</sub>-PF127 15%).

**Figura 58.** Firmeza (F<sub>máx.</sub>) dos hidrogéis de PF 127 **(A)** e das dispersões NLC<sub>i</sub>-PF 127 preparadas com diferentes percentagens de PF 127 **(B)** antes e depois da diluição em STF à temperatura de  $25\pm 2^\circ\text{C}$  e de  $35\pm 2^\circ\text{C}$  (Média  $\pm$  DP, n=3).

**Figura 59.** Adesividade (Área Negativa) dos hidrogéis de PF 127 **(A)** e das dispersões NLC<sub>i</sub>-PF 127 preparadas com diferentes percentagens de PF 127 **(B)** antes e depois da diluição em STF à temperatura de  $25\pm 2^\circ\text{C}$  e de  $35\pm 2^\circ\text{C}$  (Média  $\pm$  DP, n=3).

**Figura 60.** Reogramas dos hidrogéis de PF 127 **(A)** e das dispersões NLC<sub>i</sub>-PF 127 preparadas com diferentes percentagens de PF 127 **(B)** antes e depois da diluição em STF à temperatura de  $35\pm 0,5^\circ\text{C}$ .

**Figura 61.** Efeito da adição das diferentes dispersões coloidais desenvolvidas na viabilidade celular. **(A)** NLC<sub>p</sub> – NLC placebo; **(B)** NLC<sub>i</sub> – NLC encapsulando



o ibuprofeno; **(C)** NLC<sub>p</sub>-PF 127 15% - NLC placebo com PF 127 15% (m/m); **(D)** NLC<sub>i</sub>-PF 127 15% - NLC encapsulando o ibuprofeno com PF 127 15% (m/m). Os resultados estão apresentados como Média ± DP de 4 experiências independentes (tendo sido cada experiência efetuada pelo menos em triplicado) e expressos como percentagem de redução do reagente Alamar Blue relativamente às células de controlo [redução do Alamar Blue (% do controlo)]. As comparações estatísticas entre os grupos foram efetuadas recorrendo ao Two-way ANOVA, seguido do *Bonferroni's multiple comparisons post hoc test* [**\*\*** p <0,01, **\*\*\*** p <0,001, **\*\*\*\*** p <0,0001 concentração vs. controlo (0 µg/mL); **#**p <0,05, **##**p <0,01 48 ou 24 h vs. 72 h, para cada concentração].

**Figura 62.** Fotografias das HET-CAM de um ovo por grupo testado, antes da aplicação da amostra/solução e no final do ensaio (5 minutos).

**Figura 63.** Perfis de libertação *in vitro* do ibuprofeno a partir das formulações HGi-PF 127 15% (m/m), NLC<sub>i</sub> e NLC<sub>i</sub>-PF 127 15% (m/m).

## Capítulo 6

**Figura 64.** Incorporação a frio do polímero termossensível PF 127 na dispersão coloidal NLC<sub>i</sub>-CS.

**Figura 65.** Perfis térmicos obtidos por DSC: **(A)** Termogramas do ibuprofeno, do lípido, do polímero PF 127, do polímero CS e da mistura lipídica com o ibuprofeno. **(B)** Termogramas das dispersões NLC-CS placebo (NLC<sub>p</sub>-CS 1%), das dispersões NLC-CS encapsulando o ibuprofeno (NLC<sub>i</sub>-CS 1%), das NLC-CS placebo com PF 127 20% (m/m) (NLC<sub>p</sub>-CS 1%+PF 127 20%) e das dispersões NLC-CS com ibuprofeno e com PF 127 20% (m/m) (NLC<sub>i</sub>-CS+PF 127 20%).

**Figura 66.** Reogramas das dispersões NLC<sub>i</sub>-CS com diferentes agentes isotonzantes sem **(A)** e com PF 127 20% (m/m) **(B)**.

**Figura 67.** Efeito da adição de diferentes agentes isotonzantes às dispersões coloidais NLC<sub>i</sub>-CS 1% com e sem PF 127 20% (m/m) nos valores de Z-average, índice de polidispersão (PI) e potencial zeta (ZP). Os diferentes resultados foram expressos como média ± DP, realizados em triplicado. As comparações estatísticas foram efetuadas recorrendo ao Two-way ANOVA, seguido do *Tukey's multiple comparisons test* [**Z-ave** - **\*\*** p<0.01; **\*\*\*** p<0.001; **\*\*\*\*** p<0.0001 vs. NLC<sub>i</sub>-CS 1% Original; **#**p<0.05; **##**p<0.01 vs. NLC<sub>i</sub>-CS 1% +

PF 127 20% Original; **PI** - \*\*  $p < 0.01$  vs. NLCi-CS 1% Original; # $p < 0.05$ ; ## $p < 0.01$  vs. NLCi-CS 1% + PF 127 20% Original; **ZP** - \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$  vs. NLCi-CS 1% Original; #### $p < 0.0001$  vs. NLCi-CS 1% + PF 127 20% Original].

**Figura 68.** Valores de Z-ave, índice de polidispersão (PI) e potencial zeta (ZP) das diferentes dispersões NLC. Os diferentes resultados foram expressos como média  $\pm$  DP, realizados em triplicado. As comparações estatísticas foram efetuadas utilizando o teste One-way ANOVA, seguido pelo *Tukey's multiple comparisons test* [**Z-ave** - \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$  vs. NLCi (final); ## $p < 0.01$ ; ### $p < 0.001$ ; #### $p < 0.0001$ ; **PI** - \*\*\*\*  $p < 0.0001$  vs. NLCi (final); ## $p < 0.01$ ; #### $p < 0.0001$ ; **ZP** - \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$  vs. NLCi (final); ## $p < 0.01$ ; #### $p < 0.0001$ ].

**Figura 69.** Imagens de CryoSEM das diferentes dispersões: NLC<sub>i</sub> (**A**), NLC<sub>i</sub>-CS 1% (**B**) e (**C**) (ampliação de 40000x).

**Figura 70.** Representação gráfica da reta de calibração relativa ao estudo da linearidade da resposta do detetor do método de doseamento espectrofotométrico do ibuprofeno.

**Figura 71.** Firmeza (F<sub>máx.</sub>) (**A**) e Adesividade (Área negativa) (**B**) das dispersões NLC<sub>i</sub>-CS com e sem polímero termossensível PF 127, com e sem diluição em STF, a 25 $\pm$ 2°C e a 35 $\pm$ 2°C (Média  $\pm$  DP, n=3).

**Figura 72.** Reogramas das dispersões NLC<sub>i</sub>-CS sem (**A**) e com PF 127 20% (m/m) (**B**), com e sem diluição em STF na proporção de 40:7, à temperatura de 35 $\pm$ 0,5°C.

**Figura 73.** Efeito da adição de fluido lacrimal artificial (STF) pH 7,4 com e sem mucina 0,4 mg/mL ou lisozima 1,0 mg/mL nos valores de Z-ave, índice de polidispersão (PI) e potencial zeta (ZP) das dispersões coloidais NLCi-CS 1 % e NLCi-CS 1%+PF 127 20% isotonizadas com glicerina. Os resultados estão expressos como media  $\pm$  SD (realizado em triplicado). As comparações estatísticas foram efetuadas utilizando o teste Two-way ANOVA, seguido pelo *Tukey's multiple comparisons test* [**Z-ave** - \*\*  $p < 0.01$  vs. NLCi-CS 1% Glicerina + STF; **PI** - \*  $p < 0.05$  vs. NLCi-CS 1% Glicerina + STF; **ZP** - #### $p < 0.0001$  vs. NLCi-CS 1% + PF 127 Glicerina+ STF].

**Figura 74.** Reogramas das dispersões NLC<sub>i</sub>-CS sem (**A**) e com adição de PF 127 20% (m/m) (**B**), com diluição em STF com 8% (m/m) e 15% (m/m) de mucina, na proporção de 40:7, a uma temperatura de 35 $\pm$ 0,5°C.

**Figura 75.** Força de Adesão (**A**) e Trabalho de Adesão (**B**) da dispersão NLC<sub>i</sub>-

CS+PF 127 20% (m/m), com diluição em STF com 8% (m/m) e 15% (m/m) de mucina, na proporção de 40:7 a uma temperatura de  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

**Figura 76.** Ilustração do resultado final do ensaio de redução do Alamar Blue em células Y-79, 72 horas após a exposição às formulações NLC<sub>i</sub>, NLC<sub>i</sub> - CS 1% (m/m) e NLC<sub>i</sub> - CS 1% (m/m) + PF 127 20% (m/m) na gama de concentrações de 0 - 1000 µg/mL. A coloração azul observada nas concentrações mais elevadas demonstra uma reduzida redução do Alamar Blue, comparativamente à coloração arroxeadas observada nas células controlo (0 µg/mL). 214

**Figura 77.** Imagens representativas de microscopia ótica das células Y-79 expostas à formulação NLC<sub>i</sub> (0 - 1000 µg/mL) durante 24, 48 e 72 h. Ampliação da objetiva: 10 X. Escala indicada nas imagens - 100 µm. 215 Imagens recolhidas com o microscópio Nikon TS 100F equipado com uma câmara digital DS-Fi1.

**Figura 78.** Imagens representativas de microscopia ótica das células Y-79 expostas à formulação NLC<sub>i</sub>-CS 1 % (m/m) (0 - 1000 µg/mL) durante 24, 48 e 72 h. Ampliação da objetiva: 10 X. Escala indicada nas imagens - 100 µm. 216 Imagens recolhidas com o microscópio Nikon TS 100F equipado com uma câmara digital DS-Fi1.

**Figura 79.** Imagens representativas de microscopia ótica das células Y-79 expostas à formulação NLC<sub>i</sub>-CS 1 % (m/m) + PF 127 20% (m/m) (0 - 1000 µg/mL) durante 24, 48 e 72 h. Ampliação da objetiva: 10 X. Escala indicada 217 nas imagens - 100 µm. Imagens recolhidas com o microscópio Nikon TS 100F equipado com uma câmara digital DS-Fi1.

**Figura 80.** Efeito das diferentes dispersões coloidais preparadas na viabilidade celular. **(A)** NLC<sub>i</sub> - NLC encapsulando o ibuprofeno; **(B)** NLC<sub>i</sub> - CS 1% - NLC encapsulando o ibuprofeno disperso num hidrogel de CS 1% (m/m); **(C)** NLC<sub>i</sub> - CS 1% + PF 127 20% - NLC encapsulando o ibuprofeno disperso num hidrogel de CS 1% (m/m) com PF 127 20 % (m/m). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  DP, de 6 experiências independentes (cada 219 experiência foi realizada pelo menos em triplicado), e expressos como percentagem de redução do reagente Alamar Blue relativamente às células controlo [redução do Alamar Azul (% de controlo)]. As comparações estatísticas entre grupos foram efetuadas utilizando o Two-way Anova, seguido do *Tukey's multiple comparisons post hoc test* [\*\*\*\*p <0,0001

concentração vs. controlo (0 µg / mL), a cada tempo de incubação; ####p <0,0001 48 ou 72 horas vs. 24 horas, para cada concentração; \$\$p <0,01, \$\$\$p <0,0001 vs. 72 horas vs. 48 horas, para cada concentração].

**Figura 81.** Perfil de libertação *in vitro* do ibuprofeno a partir das formulações NLC<sub>i</sub>, NLC<sub>i</sub>-CS 1% (m/m) e NLC<sub>i</sub>-CS 1% (m/m) + PF 127 20% (m/m).

220

## Índice de tabelas

### Capítulo 1

<b>Tabela I.</b> Exemplos de polímeros sensíveis a estímulos que podem ser utilizados em formulações oftálmicas tópicas.	26
<b>Tabela II.</b> Exemplos da utilização de poloxâmeros em formulações oftálmicas tópicas.	32
<b>Tabela III.</b> Exemplos da utilização do quitosano em formulações oftálmicas tópicas.	37
<b>Tabela IV.</b> Exemplos da utilização de formulações oftálmicas preparadas utilizando dois ou mais polímeros sensíveis a estímulos.	38
<b>Tabela V.</b> Exemplos da utilização de nanopartículas poliméricas em formulações oftálmicas tópicas.	43
<b>Tabela VI.</b> Exemplos da utilização de nanopartículas lipídicas em formulações oftálmicas de aplicação tópica.	54

### Capítulo 2

<b>Tabela VII.</b> Parâmetros necessários na validação de um método analítico (adaptado de ICH Q2 (R1) [363]).	75
<b>Tabela VIII.</b> Pontuações a atribuir nos tempos definidos.	93

### Capítulo 3

<b>Tabela IX.</b> Valores das absorvências lidas para o estudo de linearidade da resposta do detetor do método analítico de doseamento espectrofotométrico do ibuprofeno.	113
<b>Tabela X.</b> Avaliação da repetibilidade do método de doseamento espectrofotométrico do ibuprofeno.	114
<b>Tabela XI.</b> Avaliação da exatidão do método de doseamento espectrofotométrico do ibuprofeno.	114
<b>Tabela XII.</b> Valores das absorvências lidas para o estudo de linearidade da resposta do detetor do método de doseamento espectrofotométrico da hidrocortisona.	116
<b>Tabela XIII.</b> Avaliação da repetibilidade do método de doseamento espectrofotométrico da hidrocortisona.	117

<b>Tabela XIV.</b> Avaliação da exatidão do método de doseamento espectrofotométrico da hidrocortisona.	118
---	-----

#### Capítulo 4

<b>Tabela XV.</b> Composição das diferentes dispersões de NLC (P - Placebo; i - Ibuprofeno; NLC <sub>P</sub> - NLC placebo; NLC <sub>i</sub> – NLC encapsulando o ibuprofeno; NLC <sub>i</sub> -PF 127 n% – NLC encapsulando o ibuprofeno contendo diferentes percentagens (m/m) de polímero termossensível).	124
<b>Tabela XVI.</b> Temperaturas de transição sol-gel das diferentes dispersões NLC <sub>i</sub> preparadas com diferentes percentagens de PF 127 (Média ± DP, n=3).	127
<b>Tabela XVII.</b> Valores das absorvências lidas para o estudo de linearidade da resposta do detetor do método de doseamento espectrofotométrico do ibuprofeno.	137
<b>Tabela XVIII.</b> Avaliação da repetibilidade do método de doseamento espectrofotométrico do ibuprofeno.	138
<b>Tabela XIX.</b> Avaliação da exatidão do método de doseamento espectrofotométrico do ibuprofeno.	139
<b>Tabela XX.</b> Valores das absorvências lidas para o estudo de linearidade da resposta do detetor do método de doseamento espectrofotométrico do ibuprofeno.	147
<b>Tabela XXI.</b> Avaliação da repetibilidade do método de doseamento espectrofotométrico do ibuprofeno.	149
<b>Tabela XXII.</b> Avaliação da exatidão do método de doseamento espectrofotométrico do ibuprofeno.	149

#### Capítulo 5

<b>Tabela XXIII.</b> Composição das diferentes dispersões NLC (P - Placebo; i - Ibuprofeno; NLC <sub>P</sub> - NLC placebo; NLC <sub>i</sub> – NLC encapsulando o ibuprofeno; NLC <sub>i</sub> -PF 127 n% – NLC encapsulando o ibuprofeno contendo diferentes percentagens (m/m) de polímero termossensível).	157
<b>Tabela XXIV.</b> Temperaturas de transição sol-gel das diferentes dispersões NLC <sub>i</sub> preparadas com diferentes concentrações de PF 127 (Média ± DP, n=3).	160
<b>Tabela XXV.</b> Resultados obtidos nos controlos do ensaio de irritabilidade	176

ocular (n=3).

**Tabela XXVI.** Resultados brutos para a amostra testada à temperatura de 37°C (n=5) 177

**Tabela XXVII.** Resultados brutos para a amostra testada à temperatura de 4°C (n=3). 177

**Tabela XXVIII.** Resultados gerais obtidos para a amostra (n=3 a 4°C; n=5 a 37°C). 178

## Capítulo 6

**Tabela XXIX.** Composição das diferentes dispersões NLC (P - Placebo; i - ibuprofeno; NLC<sub>P</sub> - NLC placebo; NLC<sub>i</sub> – NLC encapsulando o ibuprofeno). 185

**Tabela XXX.** Temperaturas de transição sol-gel das dispersões NLC<sub>i</sub>-CS preparadas com diferentes percentagens de PF 127 (Média ± DP, n=3). 187

**Tabela XXXI.** Efeito da adição de diferentes agentes isotonzantes às dispersões NLC. 190

**Tabela XXXII.** Valores de Osmolalidade das diferentes dispersões coloidais preparadas (Média ± DP, n=3). 195

**Tabela XXXIII.** Temperatura de transição sol-gel das diferentes dispersões NLC<sub>i</sub>-CS+PF 127 20% preparadas com diferentes percentagens de CS (Média ± DP, n=3). 195

**Tabela XXXIV.** Valores das absorvências lidas para o estudo de linearidade da resposta do detetor do método de doseamento espectrofotométrico do ibuprofeno. 200

**Tabela XXXV.** Avaliação da repetibilidade do método de doseamento espectrofotométrico do ibuprofeno. 202

**Tabela XXXVI.** Avaliação da exatidão do método de doseamento espectrofotométrico do ibuprofeno. 202

## **Lista de abreviaturas e símbolos:**

A - Absorvência;  
ATP - Adenosina Trifosfato;  
AUC - Área sob a curva;  
BS - Luz retrodifundida ou refletida;  
CAM - Membrana corioalantônica;  
CAP - Acetatoftalato de celulose;  
cm - Centímetro;  
CMC - Carboximetilcelulose;  
COMP - Compritol® ATO 888;  
COS - Quitosano oligossacarídeo;  
cryoSEM - Microscopia eletrônica de varrimento de alta resolução a baixa temperatura;  
CS - Quitosano;  
CTAB - Brometo de cetiltrimetilamônio;  
DLS - Dispersão dinâmica da luz;  
DMSO - Dimetilsulfóxido;  
DNA - Ácido Desoxirribonucleico;  
DP - Desvio padrão;  
DSC - Calorimetria diferencial de varrimento;  
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético;  
EE - Eficácia de encapsulação;  
EHEC - Etil(hidroxietilcelulose);  
FBS - Soro fetal bovino inativado pelo calor;  
FDA – Food and Drug Administration;  
F<sub>máx</sub> - Força máxima;  
g - grama;  
Gelrite® - Goma gelana desacetilada;  
HdC - Hidrocortisona;  
HEC - Hidroxietilcelulose;  
HET-CAM - Membrana corioalantóide de ovo de galinha embrionado;  
HG - Hidrogel;  
EHL – Equilíbrio hidrófilo-lipófilo  
HPCD - Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina;  
HPH - Homogeneização a alta pressão;  
HPMC - Hidroxipropilmetilcelulose;



IBU - Ibuprofeno;  
 ICH – International Conference Harmonization;  
 kg - Quilograma;  
 LC - Capacidade de Carga;  
 LCST – Temperatura crítica de solução inferior;  
 LF-108 - Lutrol® F-108;  
 LF-127 - Lutrol® F-127;  
 m - Metro;  
 m/m - Massa/massa;  
 MC - Metilcelulose (MC);  
 mg - miligramas;  
 Min - Minuto;  
 mL - Mililitros;  
 mm - Milímetros;  
 mOsm - MiliOsmole;  
 mPa - MiliPascal;  
 mV - Milivolt;  
 N - Newton;  
 NL - Nanopartículas lipídicas;  
 NLC - Vetores lipídicos nanoestruturados;  
 nm - nanômetros  
 O/A - Óleo/Água;  
 P - Placebo;  
 P 188 - Poloxâmero 188  
 P 407 - Poloxâmero 407  
 P(L-HMPMA) - *Poly(N-(L)-(1-hydroxymethyl)propylmethacrylamide)*;  
 Pa - Pascal;  
 PAA - Ácido poliacrílico;  
 PCP - Policarbofilo;  
 PCS - Espectroscopia de correlação de fótons;  
 PDEAAm - *Poly(N,N-diethylacrylamide)*;  
 PDEAEMA - *Poly(N,N-diethylaminoethyl methacrylate)*;  
 PDMAEMA - *Poly(dimethylaminoethyl methacrylate)*;  
 PDMAEMA - *Poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate)*;  
 PEG - Polietilenoglicol;  
 PEI - *Poly(ethylenimine)*;

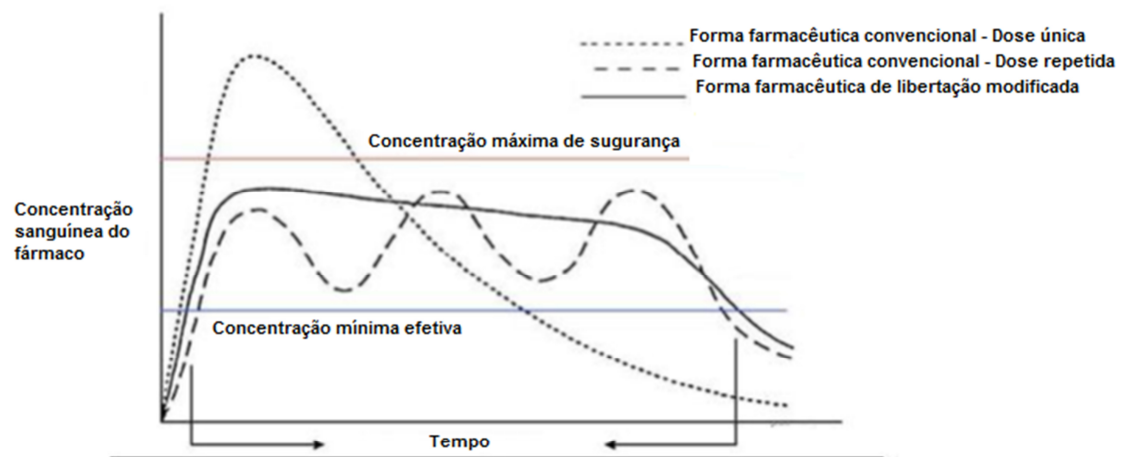
PEO - Polioxietileno;  
 PF 127 - Pluronic® F 127;  
 PF 188 - Pluronic® F 188;  
 PF 68 - Pluronic® F 68;  
 PFC - Carbómero 2001;  
 PI - Índice de Polidispersão;  
 PLA - Ácido Polilático;  
 PLGA - Ácido polilático-co-glicólico;  
 PLL - Poli-L-Lisina;  
 PLO - Organogel de lecitina e Pluronic® F 127;  
 PMAA - Ácido polimetacrílico;  
 PNIPAAm - *Poly(N-isopropylacrilamide)*;  
 PPO - Polioxipropileno;  
 PRE - Precirol® ATO 5;  
 PVAm - *Poly(vinylamine)*;  
 PVP - *Poly(N-vinylpyridine)*;  
 rpm - Rotações por minuto;  
 s - Segundo;  
 SDS - Laurilsulfato de sódio;  
 SEM - Microscopia eletrônica de varrimento;  
 SLN - Nanopartículas de lípido sólido;  
 Sol – Solução;  
 STF - Fluido Lacrimal Artificial;  
 T - Luz transmitida;  
 TSI - Índice de estabilidade de Turbiscan;  
 µL - Microlitro;  
 USCT - Temperatura crítica de solução superior;  
 UV-VIS - Ultravioleta-Visível;  
 v/v - Volume/volume;  
 ZP - Potencial Zeta;  
 γ - Velocidade de corte;  
 η - Viscosidade;  
 λ - Comprimento de onda;  
 τ - Tensão de corte;

## **1. Introdução**

### **1.1 Formas Farmacêuticas de Liberação Modificada**

O desenvolvimento de uma forma farmacêutica é um complexo desafio que consiste em transportar o fármaco para um determinado alvo terapêutico [1]. A utilização de uma forma farmacêutica considerada ideal faz com que o fármaco exerça uma ação terapêutica localizada, minimizando desta forma os efeitos secundários [1]. As formas farmacêuticas podem ser classificadas de acordo com diferentes critérios, entre os quais se destacam: o tipo de preparação farmacêutica, o processo de fabrico, a ação terapêutica e o modo de libertação do(s) fármaco(s) que veiculam [2]. No que se refere ao modo de libertação do(s) fármaco(s) que veiculam, as formas farmacêuticas podem classificar-se em formas de libertação convencional ou imediata e em formas de libertação modificada [2,3].

As formas farmacêuticas de libertação convencional ou imediata são aquelas em que a concentração plasmática do fármaco veiculado é diretamente proporcional à dose administrada [2-5]. Assim, é necessária uma administração múltipla para que o fármaco mantenha a concentração terapêutica de forma a exercer com eficácia o efeito terapêutico desejado. Neste tipo de forma farmacêutica, a libertação do fármaco não foi alvo de uma modificação intencional (processo específico de formulação e/ou método de fabrico especial), não interferindo nem condicionando a sua libertação, servindo somente de suporte mecânico [3]. Este tipo de formas farmacêuticas apresenta várias desvantagens, entre elas, destacam-se: a circulação sistémica de altas concentrações de fármaco, podendo provocar efeitos secundários; a reduzida acumulação do fármaco no local de ação; uma biodistribuição indiscriminada; não promovem uma proteção eficaz do fármaco contra a metabolização e apresentam excreção prematura [5-7].



**Figura 1.** Comparação entre os níveis plasmáticos de um fármaco administrado através de uma forma farmacêutica convencional e através de uma forma de liberação modificada (adaptado com permissão de Bajpai *et al.* 2008 [8]).

As formas farmacêuticas de liberação modificada são preparações farmacêuticas em que a liberação da(s) substância(s) ativa(s) foi objeto, quanto à velocidade e/ou ao local onde ocorre, de uma modificação deliberada resultante de um processo específico de formulação e/ou de um método de fabrico especial [2-4]. O(s) fármaco(s) veiculado(s) por este tipo de formulações farmacêuticas são libertados a velocidades pré-definidas, durante um determinado tempo, após a sua administração, obtendo-se uma modulação da ação terapêutica [2,4]. Para obter formas farmacêuticas de liberação modificada pode-se recorrer à modificação do próprio fármaco (alteração das propriedades físico-químicas através da formação de complexos ou através da síntese de pró-fármacos) ou à modificação da forma farmacêutica [9]. Assim, existem diferentes tipos de formas farmacêuticas de liberação modificada [1-3]. A Farmacopeia Portuguesa define três tipos de formas farmacêuticas de liberação modificada, nomeadamente as formas de liberação: prolongada, retardada e sequencial [3]. Para além destas formas farmacêuticas de liberação modificada, é possível encontrar na bibliografia outros exemplos, entre os quais se destacam, as formas farmacêuticas de ordem zero, as formas farmacêuticas de liberação programada, as formas farmacêuticas de liberação acelerada e as formas farmacêuticas de liberação bifásica [4]. As diferentes formas farmacêuticas de liberação modificada definem-se da seguinte forma [1-5]:

- formas farmacêuticas de libertação prolongada - a velocidade de libertação da(s) substância(s) ativa(s) é inferior à das formas de libertação convencional administradas pela mesma via;
- formas farmacêuticas de libertação retardada - a libertação da(s) substância(s) ativa(s) ocorre após um período de latência;
- formas farmacêuticas de libertação sequencial ou pulsátil - a libertação da(s) substância(s) ativa(s) ocorre de um modo intermitente ou sequencial no tempo;
- formas farmacêuticas de libertação ordem zero - a libertação da(s) substância(s) ativa(s) é constante por unidade de tempo;
- formas farmacêuticas de libertação programada - a libertação da(s) substância(s) ativa(s) está dependente de uma interação com o meio exterior ou interior do organismo;
- formas farmacêuticas de libertação acelerada - a libertação da(s) substância(s) ativa(s) é superior às formas de libertação convencional administradas pela mesma via;
- formas farmacêuticas de libertação bifásica – compostas por dois períodos distintos de libertação da(s) substância(s) ativa(s): rápida/lenta ou lenta/rápida;

As formas farmacêuticas de libertação modificada proporcionam uma diminuição da frequência de administração, mantendo uma concentração plasmática do fármaco adequada, apresentando uma biodisponibilidade superior, diminuindo desta forma os efeitos secundários, aumentando a adesão à terapêutica [1,4,9,10]. Por outro lado, as formas farmacêuticas de libertação modificada também podem apresentar algumas desvantagens, entre as quais destacam-se o facto de não produzirem efeitos terapêuticos imediatos após a sua administração, além do facto deste tipo de formulações serem idealizadas para tempos de semivida biológica de uma população considerada normal, e se por algum motivo (doença ou outro evento clínico), existirem alterações na distribuição e metabolização do fármaco, podem ocorrer alterações no efeito terapêutico pretendido [4,9]. Por outro lado, existem fármacos que devido às suas características não tiram partido das vantagens do conceito de forma farmacêutica de libertação modificada [4,9]. Este tipo de fármacos apresenta as seguintes características: não são absorvidos eficazmente pelo intestino; são absorvidos e excretados rapidamente; possuem tempos de semivida biológica prolongados ou são necessários em doses bastante elevadas [5].

## 1.2 Formas Farmacêuticas para Aplicação Ocular

O globo ocular é um órgão bastante complexo composto por um conjunto de estruturas e membranas com funções fisiológicas muito específicas [11-16]. As propriedades únicas dos tecidos oculares, aliadas ao facto de existirem mecanismos de defesa no globo ocular que o protegem das agressões externas, fazem da administração tópica de fármacos, um desafio único [13-15,17]. A tendência natural do globo ocular quando lhe é administrado algo topicamente é de tentar eliminar, o mais rapidamente possível, o elemento considerado estranho.

A aplicação tópica de fármacos oftálmicos sob a forma de colírios (soluções e suspensões) é a via de administração mais importante, mais usada (90% das formulações de aplicação ocular) e melhor aceite pelos pacientes para o tratamento de diferentes patologias oculares [11,16,18-22]. De facto, a administração sistémica de um fármaco com o intuito de atingir um alvo terapêutico nos tecidos oculares assume-se como uma estratégia com pouca viabilidade devido à barreira hemato-aquosa e à barreira hemato-retiniana existentes no globo ocular, dificultando e limitando o acesso ao humor aquoso ou ao humor vítreo [16,17,19,20]. Estas barreiras evitam que toda e qualquer substância atinja os tecidos oculares interiores.

É unanimemente aceite que as formulações farmacêuticas oftálmicas tópicas, ditas de convencionais ou tradicionais, apresentam uma reduzida resposta terapêutica devido ao facto de serem rapidamente eliminadas da zona pré-corneal [10,11,13,16,19,23-36]. Acredita-se que o tempo de residência ocular da grande maioria das formulações oftálmicas convencionais se situa entre 5 a 25 minutos, sendo que somente 1-10% da concentração de fármaco administrado é absorvida e penetra os tecidos oculares, sendo o restante fármaco absorvido de forma sistémica, produzindo efeitos secundários [18,19,21,31,37,38]. Estas formulações administradas sob a forma de colírios são facilmente eliminadas da zona pré-corneal por várias razões, destacando-se:

- lacrimejar;
- pestanejar;
- diluição no fluido lacrimal;
- drenagem por gravidade;
- capacidade limitada do saco conjuntival sendo o excesso de fluido lacrimal removido através do movimento das pálpebras e pela drenagem nasolacrimal (o volume residente de fluido lacrimal é de 7-10 µL, enquanto que o saco conjuntival apresenta uma capacidade máxima de 30 µL);
- renovação natural e constante do fluido lacrimal;

- presença de muitas barreiras fisiológicas do olho (ex. córnea, conjuntiva, esclera, etc.);
- metabolismo enzimático nos tecidos oculares;
- ausência de libertação prolongada do(s) fármaco(s) veiculado(s);
- ausência de propriedades mucoadesivas das formulações [13-19,21,23-31,35,36,39-47].

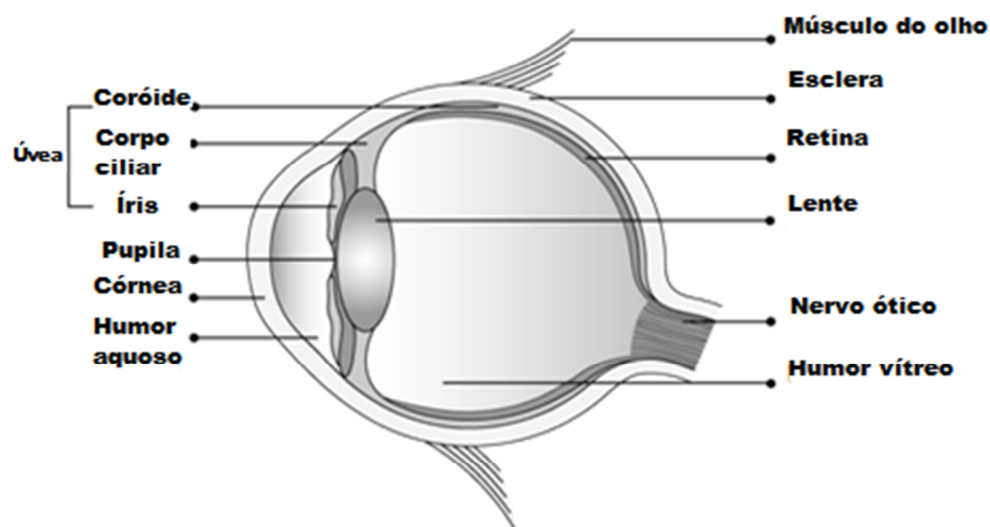
Aliado a tudo isto, o globo ocular é constituído por um conjunto de mecanismos de defesa, estruturas, membranas e tecidos com características muito específicas que limitam drasticamente a absorção e a permeação dos fármacos nos tecidos intraoculares [13,16,19,21,23,28,29,35,36,47,48].

Para assegurar um efeito terapêutico desejado, e atendendo ao facto das formas farmacêuticas oftálmicas convencionais apresentarem uma absorção limitada, promovendo um efeito terapêutico de curta duração, é necessário recorrer a administrações repetidas ao longo do dia para atingir o efeito terapêutico desejado [11,29,36,48]. Neste tipo de formulações, devido às limitações de permeabilidade, a substância ativa encontra-se, geralmente, em concentrações elevadas podendo provocar efeitos secundários diversos, incluindo danos celulares na superfície ocular [11,29,48].

Uma formulação farmacêutica oftálmica considerada ideal deve prolongar o tempo de contacto e de residência na superfície ocular, diminuindo a eliminação preliminar do fármaco, aumentando desta forma a eficácia terapêutica. Além disso, uma formulação ocular de administração tópica deve ser de fácil administração, não irritante, apresentar propriedades reológicas adequadas, devendo também ser estéril e isotónica [13,19]. De forma a contornar os problemas associados à administração tópica de fármacos oftálmicos pode-se recorrer a diferentes estratégias. Estas estratégias têm por objetivo promover um aumento da biodisponibilidade ocular do fármaco através do prolongamento do tempo de contacto da formulação oftálmica com os tecidos oculares [14,15,19,35]. A utilização nas formas farmacêuticas oftálmicas de agentes viscosificantes, hidrogéis, sistemas compostos por polímeros sensíveis a estímulos, micropartículas e transportadores coloidais (ex. micelas, nanosuspensões, nanoemulsões, nanomicelas, lipossomas, nanopartículas poliméricas e lipídicas) promovem o aumento da eficácia terapêutica, uma vez que, aumentam tempo de residência e a permeabilidade do fármaco nos tecidos oculares, reduzindo por outro lado os efeitos secundários [13,18,21,23,34,35,37,39,43,45,46,49-59].

### 1.2.1 Anatomia e fisiologia do sistema ocular

O olho é um órgão único, constituído por diferentes estruturas e tecidos com funções muito específicas, estando dividido em duas regiões anatómicas, o segmento anterior (córnea e conjuntiva) e o segmento posterior (retina) [11,12,14,15]. O globo ocular funciona como um sistema ótico complexo que recolhe luz do meio circundante, sendo a intensidade desta luz regulada pelo diafragma, concentrando-a através de um conjunto de lentes ajustáveis de forma a formar uma imagem, convertendo por fim essa imagem em sinais elétricos, transmitindo esses sinais através de vias neuronais complexas do nervo ótico até ao córtex visual ou a outras áreas do cérebro [60]. A Figura 2 ilustra as principais estruturas do globo ocular:



**Figura 2.** Estrutura do globo ocular (adaptado com a permissão da Sociedade Canadiana do Cancro).

O globo ocular é constituído por três camadas primárias, destacando-se a camada exterior designada por esclera (camada fibrosa com função de proteção), a camada intermédia designada por úvea (função vascular e nutritiva, contém tecido pigmentado constituído pela coróide, corpo ciliar e íris) e a camada interior designada por retina (camada sensorial) [19,61,62].

A córnea, a conjuntiva e a esclera são três estruturas que desempenham um papel fundamental na absorção de fármacos existentes na zona pré-corneal. A córnea é uma estrutura transparente clara, não vascularizada, localizada na superfície externa do



olho, com uma espessura de 0,5-1 mm, composta por cinco camadas, entre as quais se destacam, o epitélio (maior barreira hidrofílica para a difusão transcorneal), a membrana de Bowman, o estroma (maior barreira lipofílica para a difusão transcorneal), a membrana de Descemet e o endotélio (menor barreira lipofílica para a difusão transcorneal, sendo responsável por manter a hidratação normal da córnea) [19,31,63-66]. Apesar da córnea ser constituída por cinco camadas, só três camadas (epitélio, estroma e endotélio) desempenham funções de barreira [23,31,65]. De facto, as junções apertadas existentes entre as células do epitélio corneal servem de barreira seletiva prevenindo a difusão transcorneal através da via paracelular de moléculas de grandes dimensões [19,63]. A córnea é um dos tecidos mais sensíveis do nosso organismo, tendo uma função de proteção, sendo assim uma barreira quase impermeável que limita a absorção ocular, apresentando uma alta resistência à difusão passiva de fármacos, atuando também como a lente mais externa do olho [31,64,65,67].

A conjuntiva é também ela uma estrutura transparente clara, fina, mucosa, mas ao contrário da córnea é vascularizada, permitindo a absorção de alguns fármacos [19,46,63,66,67]. A absorção de fármacos a partir da conjuntiva é, em geral, superior à absorção verificada através da córnea [63]. Esta estrutura reveste a superfície interna das pálpebras e cobre a parte anterior da esclera até à córnea [19,63]. Esta estrutura é constituída pelas células goblet, que segregam um volume aproximado de 2-3 µL de muco por dia, que recobre a superfície da conjuntiva e da córnea, tendo como principais funções, a hidratação, a limpeza, a lubrificação e a defesa contra agentes patogénicos exteriores [19,46].

A esclera é, por sua vez, a camada exterior de suporte do globo ocular, compreendida entre a margem da córnea até ao nervo ótico, sendo uma estrutura fibrosa ligeiramente elástica, opaca, com uma composição similar à córnea, que desempenha funções de proteção, servindo também para manter a pressão intraocular e onde os músculos extraoculares se fixam [61,62,65,66].

### 1.2.2 Composição do fluido lacrimal

O fluido lacrimal cobre a superfície do olho, a córnea e a conjuntiva, sendo segregado pelas glândulas lacrimal e conjuntival, é composto por três camadas, a camada lipídica superficial, a camada aquosa intermédia e a camada mucosa profunda [19,39,46,64,66,68]. O volume total do fluido lacrimal na superfície ocular situa-se entre os 7-10 µL [39,46]

A camada lipídica superficial tem como principal função evitar a evaporação da camada aquosa intermédia, além de lubrificar a superfície da conjuntiva e da córnea, sendo segregada pelas glândulas Meibomian (produzem ésteres, triacilgliceróis, esteróis livres e ácidos gordos livres) e pelas células goblet da conjuntiva (produzem a mucina – família de glicoproteínas) [64,68-70].

A camada aquosa intermédia representa 90% do fluido lacrimal, sendo basicamente, uma solução salina segregada principalmente pelas glândulas lacrimais acessórias, contendo sais inorgânicos, biopolímeros, proteínas, glicoproteínas glucose e ureia [23,64,69]. Por último, a camada mucosa profunda que contém mucina produzida pelas células caliciformes conjuntivais, estando esta camada intimamente ligada ao epitélio corneal e conjuntival, sendo uma camada hidrofílica que adere à superfície ocular lipofílica, diminuindo a tensão superficial com a camada lipídica [23,64,68,69,70].

A produção e a constante renovação do fluido lacrimal são essenciais para manter as normais funções do olho, além de promover a proteção e a limpeza. Além destas funções, o fluido lacrimal mantém um ambiente húmido para as células epiteliais da córnea e da conjuntiva, lubrifica as pálpebras, transporta produtos metabólicos para e a partir das células epiteliais da córnea (principalmente oxigénio e dióxido de carbono), tem propriedades bactericidas, e desempenha funções de proteção física e imunológica contra agentes externos (dilui, lava e remove) [68,70].

### 1.2.3 Limitações fisiológicas e farmacocinéticas da administração ocular

A absorção intraocular e a eficácia terapêutica de um fármaco administrado sob a forma de um colírio está dependente da relação entre as características físico-químicas associadas aos sistemas farmacêuticos e as características das diferentes estruturas dos tecidos oculares [23]. Após a administração tópica de um colírio, este é adsorvido pela córnea, conjuntiva e esclera. A permeabilidade da córnea a uma determinada forma farmacêutica e ao respetivo fármaco é o fator limitante e que determina a concentração do agente terapêutico no humor aquoso [19]. Além das limitações de permeabilidade impostas pelos diferentes tecidos oculares, este órgão possui um conjunto de mecanismos de defesa que protegem o olho de agentes exteriores, o que provoca uma absorção muito limitada do fármaco, condicionando a eficácia terapêutica [40,41,44]. O lacrimejar e o pestanejar são dois dos principais mecanismos que protegem os tecidos oculares [19,40,41,44].

Os colírios existentes no mercado apresentam um volume por gota entre os 25 e os 56  $\mu\text{L}$ , apresentando um volume médio por gota de 39  $\mu\text{L}$  [39,41]. Assim, após a administração tópica do colírio, regista-se uma mistura da formulação oftálmica no fluido lacrimal (tempo de residência ocular da mistura é de poucos minutos, devido à produção permanente de fluido lacrimal de 0,5-2,2  $\mu\text{L}/\text{min}$ , com uma taxa de renovação de 1  $\mu\text{L}/\text{min}$ ), sendo o excesso de volume removido através da drenagem no ducto nasolacrimal em poucos minutos e/ou através da drenagem por gravidade, aliada ao natural pestanejar, resultando numa diminuição drástica da concentração de fármaco após alguns minutos da instilação ocular [11,22,25,42,44,46,63,71]. O volume máximo que o saco conjuntival pode conter momentaneamente é de 30  $\mu\text{L}$ , sendo o excesso removido rapidamente por gravidade com ajuda do pestanejar ou através do sistema de drenagem nasolacrimal (ducto nasolacrimal) de forma a retomar o volume normal de fluido lacrimal [21,39,41]. Verifica-se também que a cada 12 segundos, devido ao normal pestanejar das pálpebras, existe uma drenagem do fluido lacrimal no ducto nasolacrimal, o que só por si, reduz a eficácia de uma formulação oftálmica convencional [19].

A absorção sistémica do fármaco administrado topicamente no globo ocular, promove uma redução da quantidade de fármaco disponível para atingir o alvo terapêutico intraocular [42,72]. Desta forma, através dos vasos capilares existentes no saco conjuntival ou através da drenagem na cavidade nasal através do ducto nasolacrimal, verifica-se uma absorção sistémica do fármaco, podendo ocorrer efeitos adversos [42,72].

As propriedades físico-químicas do fármaco, como sejam, a solubilidade, o tamanho, a estrutura molecular, a carga e o grau de ionização afetam a forma e a taxa de permeação do mesmo através dos tecidos oculares [23]. Dependendo da natureza do fármaco (lipófila ou hidrófoba) este pode penetrar o epitélio corneal através da via paracelular ou através da via transcelular [19,23]. Assim, após a administração tópica, a preparação oftálmica mistura-se com o fluido lacrimal na zona pré-corneal.

Se estivermos na presença de um fármaco lipófilo, este pode penetrar os tecidos oculares através da córnea ou da conjuntiva. Os fármacos lipófilos podem facilmente atravessar o epitélio corneal (maior barreira da córnea para os fármacos hidrófilos) por via transcelular através do transporte facilitado ou por difusão através da bicamada lipídica [67]. Depois de atravessar o epitélio corneal, o fármaco lipófilo depara-se com o estroma (maior barreira da córnea para fármacos lipófilos), atuando assim como um reservatório que promove uma libertação prolongada de fármaco para a câmara anterior ou humor aquoso [67,73]. Do humor aquoso, o fármaco atinge os tecidos oculares como por exemplo, a lente ou o corpo ciliar/íris, onde aqui se pode ligar à melanina [41,42].

Este complexo fármaco-melanina forma uma espécie de reservatório, libertando-se assim o fármaco para os tecidos adjacentes (vítreo, retina, coróide, esclera, podendo atingir a circulação sistémica através da retina e da coróide) de forma gradual, prolongando a ação terapêutica da formulação [41,42,73]. Através da lente, o fármaco também pode atingir tecidos oculares subjacentes, como sendo, o vítreo, a retina, a coróide e a esclera [73]. Como já foi abordado, o endotélio corneal não vai oferecer grande resistência à passagem de fármacos lipófilos.

Por sua vez, os fármacos hidrófilos têm muita dificuldade em passar do fluido lacrimal onde se encontram dissolvidos para o epitélio corneal ou conjuntival, sendo a via paracelular a forma de entrada mais fácil de penetração através dos tecidos oculares [67,74,75]. De facto, a conjuntiva apresenta uma elevada permeabilidade para a grande maioria dos fármacos hidrófilos, sendo estes transportados por via paracelular. A via paracelular é a via mais utilizada para os fármacos hidrófilos atingirem os tecidos interiores oculares. Salienta-se o facto do epitélio corneal apresentar espaços intercelulares ou junções apertadas que só permitem a passagem de compostos ou fármacos de baixo peso molecular. Da conjuntiva, os fármacos podem ser absorvidos diretamente para a circulação sistémica ou podem atingir os tecidos oculares subjacentes, como sendo, a esclera, a coróide, a retina e o vítreo [73].

#### 1.2.4 Estratégias para aumentar a biodisponibilidade de formulações oftálmicas

Os sistemas terapêuticos oculares podem ser de aplicação tópica (géis poliméricos - hidrogéis bioadesivos e sistemas baseados em polímeros sensíveis a estímulos; lipossomas; micro e nanopartículas; inserts para a conjuntiva; lentes de contacto) ou de aplicação intraocular (inserts; implantes; micro e nanopartículas e lipossomas) [13,16,21,35,76,77]. As formulações farmacêuticas oftálmicas de aplicação tópica convencionais apresentam muitas limitações que condicionam a sua biodisponibilidade e eficácia terapêutica e, desta forma, este tipo de formulações oftálmicas têm que apresentar altas concentrações de fármaco, causando efeitos secundários oculares e sistémicos [40,71]. Desta forma, o aumento da biodisponibilidade de uma forma farmacêutica oftálmica proporciona uma redução do número de administrações diárias e uma consequente diminuição da concentração de fármaco na formulação, promovendo uma redução dos efeitos secundários [19].

Um dos desafios da nova geração de formulações oftálmicas de aplicação tópica é o aumento da biodisponibilidade do fármaco, recorrendo a diferentes estratégias:

- aumento do tempo de residência na zona pré-corneal através do veículo por aumento da viscosidade e da mucoadesão da formulação (recorrendo a suspensões, pomadas, veículos viscosos, veículos bioadesivos, sistemas que gelificam *in situ*, etc.);
- aumento do tempo de retenção através do uso de dispersões coloidais (recorrendo a lipossomas, nanoemulsões, nanopartículas, nanocápsulas, etc.);
- aumento do tempo de retenção através da utilização de matrizes poliméricas sólidas (recorrendo a matrizes degradáveis, matrizes não degradáveis, lentes de contacto, dispositivos controlados por membranas, etc.);
- aumento da penetração dos fármacos através dos tecidos oculares recorrendo a modificações químicas ou farmacêuticas (recorrendo ao uso de pró-fármacos, alterando a solubilidade do fármaco – compostos lipófilos penetram rapidamente através da córnea ao contrário dos compostos hidrófilos) ou através do uso de promotores de penetração (ex. Tween® 20, EDTA, sais biliares, ácido cáprico, cloreto de benzalcónio, clorobutanol, decilmetilsulfóxido, etc.) [11-19,21,23,31,35,41,57,76-78].

Uma forma farmacêutica oftálmica ideal deve não só prolongar o tempo de residência na superfície ocular como também reduzir a eliminação do fármaco [19]. Conclui-se que, o sucesso da terapia ocular aumenta significativamente se o tempo de residência do fármaco na zona pré-corneal também aumentar [25,35,48,79].

#### 1.2.4.1 Aumento da retenção através do veículo

Uma das primeiras estratégias a ser utilizada com sucesso para contornar as limitações das formulações oftálmicas tópicas convencionais foi o aumento da viscosidade da formulação utilizando géis poliméricos, recorrendo para tal a polímeros naturais, semissintéticos e sintéticos [11,16,23,35,40,80,81]. Desta forma, os géis poliméricos são classificados em dois grupos, os hidrogéis bioadesivos e os sistemas que gelificam *in situ* [18,21,40]. A otimização da viscosidade da formulação oftálmica tem que assumir um compromisso entre o aumento desejado do tempo de residência da formulação na zona pré-corneal e a tolerância do globo ocular à viscosidade da formulação, causando o mínimo desconforto possível [19,82]. O aumento indiscriminado da viscosidade pode provocar desconforto, visão turva, sensação de corpo estranho ou até mesmo irritação, o que provocará a eliminação rápida da formulação devido ao aumento do movimento reflexo das pálpebras e do lacrimejar [11,16,19,21,38,40,82-84].

A utilização de formulações oftálmicas muito viscosas promove queixas frequentes por parte dos pacientes que as utilizam. Por outro lado, pequenos incrementos na viscosidade da formulação oftálmica não se traduzem em aumentos efetivos da biodisponibilidade do fármaco. As formulações oftálmicas de administração tópica com uma viscosidade inferior a 100 mPas apresentam um tempo de retenção pré-corneal bastante reduzido, situando-se entre os 20 e os 50 segundos [82]. De acordo com algumas publicações, os tecidos oculares toleram formulações oftálmicas com uma viscosidade máxima de 50000 mPas, sem que estas causem qualquer tipo de irritação, visão turva, aumento do lacrimejar ou do movimento reflexo das pálpebras [11,19,38,82-84].

Em termos reológicos, as formulações oftálmicas devem apresentar um comportamento não Newtoniano com propriedades pseudoplásticas, afetando assim o mínimo possível o comportamento pseudoplástico do fluido lacrimal [83-84]. Nas formulações oftálmicas com este tipo de comportamento reológico verifica-se que a viscosidade diminui com o aumento da velocidade de corte, oferecendo assim, menos resistência ao pestanejar e ao movimento ocular [63].

#### 1.2.4.1.1 Hidrogéis poliméricos

Combinar o perfil de libertação de um determinado fármaco veiculado por uma determinada forma farmacêutica com a resposta às necessidades fisiológicas, traduz-se no que se pode denominar de sistema farmacêutico ideal [85]. Um sistema farmacêutico ideal pressupõe não só a modulação da libertação do fármaco veiculado de acordo com as necessidades fisiológicas ou patológicas, mas também a vetorização e a biodistribuição do fármaco num alvo específico.

Desde há muitos anos que os polímeros são utilizados na indústria farmacêutica com funções distintas, nomeadamente como adjuvantes (aumentando a solubilidade dos fármacos, aumentando os tempos de circulação sanguínea de fármacos com tempos de semivida reduzidos (ex. peptídeos ou proteínas) ou estabilizando as moléculas de fármaco) ou como suporte mecânico para a libertação dos fármacos [86-89].

Uma das estratégias que tem sido utilizada com muito sucesso no aumento da biodisponibilidade das formulações oftálmicas de administração tópica é a utilização de hidrogéis preparados com recurso a polímeros bioadesivos ou com propriedades mucoadesivas [11,12,15,16,19,21,23].

Os hidrogéis são estruturas tridimensionais, hidrófilas, compostas por redes poliméricas de homo ou co-polímeros, com propriedades físico-químicas muito específicas, permitindo desenvolver formulações com muitas aplicações médicas [12,90,91]. Além destas características, os hidrogéis são biocompatíveis, uma vez que, apresentam um elevado conteúdo de água, são biodegradáveis e flexíveis [90]. O sucesso destes hidrogéis oftálmicos depende da sua capacidade em reter o fármaco veiculado na sua rede polimérica e do facto do hidrogel ter a capacidade de aumentar o tempo de residência da formulação no epitélio corneal e conjuntival [16,91,92].

A utilização de polímeros mucoadesivos na preparação de hidrogéis de aplicação oftálmica promove um aumento do tempo de retenção do fármaco no globo ocular, uma vez que, aumenta não só a viscosidade como também confere propriedades mucoadesivas à formulação, interagindo desta forma com a camada de mucina presente nos tecidos oculares [12,16,19,21,25,40,41,44,93]. Este tipo de polímeros tem a capacidade de estabelecer ligações não covalentes com a mucina presente nos tecidos oculares [19,21,63,93]. Salienta-se que a renovação normal e natural da camada de muco é muito lenta, aproximadamente 15 a 20 horas, o que por si só aumenta o tempo de residência deste tipo de hidrogéis [19,21,63,93].

A superfície ocular, nomeadamente a córnea e a conjuntiva, apresenta cargas elétricas negativas, sendo que os polímeros mucoadesivos interatuam melhor com este tipo de cargas elétricas, promovendo um aumento da biodisponibilidade dos fármacos veiculados [21]. A presença de grupos capazes de estabelecer pontes de hidrogénio, a presença de grupos funcionais, o grau de hidratação, a concentração, a massa molecular, a conformação molecular, a flexibilidade e a mobilidade das cadeias poliméricas são características que afetam a força de mucoadesão deste tipo de polímeros [11,19,21,92]. Os polímeros mais utilizados em formulações oftálmicas são os seguintes: derivados da celulose (metilcelulose, carboximetilcelulose, hidroxipropilcelulose, hidroxietilcelulose, etil-hidroxietilcelulose); o quitosano; o ácido hialurónico; o polioxietileno; os derivados do carragenano; o ácido plurónico; a goma xantana; o álcool polivinílico; o poliálcool; o ácido poliacrílico (PAA); o policarbofilo (PCP); a polivinilpirrolidona; o polimetacrilato; a poliacrilamida, etc. [16,18,21,23,30,63,82,83,94].

Dos polímeros naturais utilizados em sistemas de libertação de fármacos destacam-se os polissacarídeos, os alginatos e o quitosano (CS) [95-97]. A utilização de polímeros naturais em formas farmacêuticas apresenta como principais vantagens o facto de estes serem biocompatíveis e biodegradáveis [8,98,99]. De referir que este tipo de polímeros podem apresentar como desvantagem o facto de poderem veicular agentes

patogénicos, podendo desta forma desencadear respostas imunes ou inflamatórias [8,98].

O desenvolvimento e síntese de polímeros sintéticos imitando biopolímeros, teve o seu início na década de setenta do século passado, apresentando finalidades muito diversificadas [88,95,100-102]. Hoje em dia, os polímeros sintéticos assumem uma preponderância crucial no desenvolvimento de sistemas de libertação de fármacos. Pode-se mesmo referir que a tecnologia moderna da libertação de fármacos é devida em grande parte aos avanços da ciência dos polímeros.

#### 1.2.4.1.2 Polímeros sensíveis a estímulos

Os polímeros sensíveis a estímulos apresentam-se como um caminho inovador no desenho de novos sistemas terapêuticos, uma vez que estes polímeros são macromoléculas que apresentam uma resposta ativa a pequenos sinais ou alterações do ambiente circundante onde se encontram, sofrendo alterações drásticas na sua microestrutura, modificando as suas propriedades físico-químicas, sendo estas transições reversíveis [8,23,81,89,90,95,102-119].

Estes polímeros quando integrados em sistemas farmacêuticos podem promover a libertação controlada de fármaco(s) em resposta a uma determinada necessidade fisiológica (estímulo) como uma determinada doença, promovendo alterações físico-químicas rápidas e reversíveis na microestrutura do sistema polimérico, resultando na libertação do fármaco veiculado [85,89,90,102,104,107,111,112,114,116,118-121]. Com a inclusão destes polímeros em sistemas farmacêuticos é possível obter uma sincronização do perfil de libertação do fármaco veiculado com as condições fisiológicas, criando mecanismos de resposta capazes de responder às variações destas condições, respondendo a variáveis (parâmetros bioquímicos, estímulos térmicos, pH, etc.) que se encontram alteradas no estado patológico [90,104,119].





**Figura 3.** Alterações físico-químicas na estrutura da rede polimérica quando na presença de um estímulo específico (adaptado com permissão de Bajpai *et al.* 2008 [8]).

As alterações físico-químicas que ocorrem na estrutura dos polímeros vão desde as alterações do estado físico, da solubilidade, da condutividade, da forma e do equilíbrio hidrófilo/lipófilo, até às transições solução-gel, sendo todas estas alterações reversíveis, ou seja, quando o estímulo cessa o polímero retoma a sua forma inicial [85,89,97,98,102-113,119,120,122]. Estas transições ou alterações na rede polimérica são devidas aos seguintes fenómenos: neutralização de grupos eletricamente carregados devido à adição de compostos de carga oposta ou devido a alterações no pH ambiental; alterações no equilíbrio hidrófilo/lipófilo do polímero ou devido a alterações nas pontes de hidrogénio provocadas pelo aumento ou diminuição da temperatura do meio ambiente circundante [119].

Assim, conclui-se que a utilização destes polímeros em sistemas farmacêuticos promove a libertação, de uma forma eficaz e num tempo definido, de uma quantidade exata de fármaco num determinado alvo terapêutico específico, aumentando a sua eficácia terapêutica, reduzindo os efeitos secundários, a dose e o número de administrações, promovendo como consequência a adesão à terapêutica [85,89,90,107,108,111-114,118,119,121,123,124].

Os polímeros sensíveis a estímulos apresentam variadíssimas vantagens, entre as quais se destacam o facto de serem biocompatíveis, não trombogénicos, manterem a estabilidade do fármaco veiculado, serem fáceis de produzir, serem resistentes, bons transportadores de nutrientes para as células, serem facilmente modificados com ligandos de adesão celular e apresentarem a habilidade para alterar o perfil de libertação dos agentes terapêuticos incorporados [89,90,108,116,119].

Além da utilização em sistemas de libertação modificada de fármacos, os polímeros sensíveis a estímulos apresentam variadíssimas utilizações biomédicas, destacando-se a aplicação em engenharia de tecidos (distribuição de células apropriadas para reparar e/ou desenvolver novos tecidos através de suportes poliméricos), a utilização em biossensores de diferentes moléculas como a glucose ou antigénios e em

dispositivos médicos (lentes de contacto ou em compressas que proporcionam ambiente húmido nas zonas lesadas para uma melhor cicatrização) [8,76,98,116,125].

#### 1.2.4.1.2.1 Estímulos que interatuam com os polímeros sensíveis a estímulos

Os estímulos que interatuam com este tipo de polímeros provocam alterações drásticas na sua microestrutura, modificando as suas propriedades físico-químicas, podendo estes ser de três tipos [8,89,97,102-104,107,110-114,118,120,121,126]:

- estímulos físicos (temperatura, ultrassons, luz, stress mecânico);
- estímulos químicos (pH e força iónica);
- estímulos biológicos (enzimas e biomoléculas)

Estes estímulos podem ser fornecidos ou controlados de forma externa e artificial ao ambiente fisiológico ou de forma interna e natural ao ambiente fisiológico [104,107,110,111,126]. Assim, são exemplo de estímulos externos artificiais os campos elétricos, magnéticos, ultrassons, luminosos, etc. [104,110,111,126]. Por outro lado, são exemplos de estímulos internos ou naturais a mudança do pH em certos tecidos ou órgãos em consequência de uma situação patológica, a mudança da temperatura ou ainda a presença de certas enzimas ou de certos antígenos [85,89,102,104,107,110-114,122,126].

Assim, existem polímeros que têm a capacidade de responder a um estímulo específico, existindo por outro lado, polímeros que respondem a mais do que um estímulo [108,113]. A criação de um sistema polimérico, composto por diferentes polímeros sensíveis a estímulos, que responda a diferentes tipos de estímulo, aumenta exponencialmente a vetorização e a eficácia terapêutica de um determinado sistema farmacêutico [103,108,110,113].

#### 1.2.4.1.2.2 Classificação dos polímeros sensíveis a estímulos

Os polímeros sensíveis a estímulos, também designados polímeros inteligentes podem ser classificados de duas formas, a primeira relacionada com o tipo de estímulo ao qual respondem e a segunda relacionada com a forma física. Como referido anteriormente, de acordo com o tipo de estímulo com o qual interatuam, os polímeros sensíveis a estímulos podem ser classificados em três grupos: os polímeros que

respondem a estímulos físicos; os polímeros que respondem a estímulos químicos e os polímeros que respondem a estímulos biológicos [120].

Por outro lado, de acordo com a forma física, os polímeros sensíveis a estímulos podem classificar-se em:

- cadeias poliméricas lineares livres em solução;
- géis físicos reversíveis ligados de forma covalente e cruzada;
- cadeias poliméricas fixas a uma determinada superfície [85,102,103,126].

Na presença de um determinado estímulo, os polímeros classificados como cadeias poliméricas lineares livres em solução (usados na bioseparação de proteínas, células e biopartículas) sofrem uma transição de fase, deixando de existir um equilíbrio entre os segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos do polímero, precipitando e convertendo-se na sua forma insolúvel devido ao aumento da hidrofobicidade [102,121]. Este facto ocorre devido à quebra das pontes de hidrogénio entre as porções hidrofílicas do polímero e a água, ou então devido à neutralização das cargas elétricas presentes na rede polimérica, verificando-se uma separação de fases, tornando-se a solução heterogénea [102,121].

Por outro lado, fazem parte dos géis físicos reversíveis ligados de forma covalente e cruzada, os hidrogéis que intumescem como resposta à presença de um determinado estímulo [97,114].

Os polímeros sensíveis a estímulos classificados como cadeias poliméricas fixadas a uma determinada superfície (também designadas por membranas ou superfícies inteligentes) têm a capacidade de quando na presença de um determinado estímulo alterarem as características da superfície onde estão fixados. O intumescimento ou a hidrofobicidade dos polímeros inseridos na superfície de algo como resposta à presença de um determinado estímulo pode ser aproveitado para promover a separação de substâncias que interagem de modo diferente com uma matriz hidrofóbica [85].

#### 1.2.4.1.2.3 Polímeros termossensíveis

A temperatura média corporal é de cerca de 37°C, apresentando zonas específicas com temperaturas distintas. A título de exemplo, a pele apresenta uma temperatura de aproximadamente 28°-32°C, enquanto a temperatura da superfície dos tecidos oculares ronda os 34-35°C [63,125]. Os polímeros sensíveis à temperatura alteram as suas características microestruturais em resposta à variação da temperatura ambiente, podendo esta característica ser explorada com o objetivo de vetorizar fármacos para determinadas zonas do nosso organismo [107,108,112,127]. Estes polímeros são os

mais seguros (biocompatíveis e biodegradáveis), mais investigados e os mais utilizados em sistemas de administração de fármacos e em biomateriais [85,109,119,116,127]. Este estímulo pode ser fornecido ou controlado de forma externa e artificial ao ambiente fisiológico através da aplicação de uma fonte de calor, ou de forma interna e natural ao ambiente fisiológico, através de um processo inflamatório ou de um estado febril [107].

Os polímeros sensíveis à temperatura podem ser de origem natural ou de origem sintética. Os polímeros naturais sensíveis à temperatura mais utilizados em sistemas terapêuticos são: a celulose (polissacarídeo natural insolúvel em água); o quitosano (CS); o xiloglucano; a gelatina e os derivados de cada um destes polímeros [127]. Os polímeros naturais como a gelatina, a amilopectina, a carragenina, a amilose e a agarose, são polímeros que, apresentam sensibilidade à temperatura com diferentes mecanismos de gelificação, formando conformações em hélice através de ligações físicas cruzadas [22,109,121]. A título de exemplo, a gelatina e a carragenina, quando sujeitas a altas temperaturas formam soluções, sendo que, a baixas temperaturas formam géis [22,98,121]. Este comportamento é similar ao da etil(hidroxietilcelulose) (EHEC), um polímero natural derivado da celulose, que diminui a viscosidade com o aumento da temperatura [98]. Outros derivados da celulose, normalmente utilizados em concentrações entre 1 a 10% (m/m), como a metilcelulose (MC) ou a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), apresentam um comportamento termossensível inverso, ou seja, com o aumento da temperatura gelificam por redução da hidratação, apresentando transições de fase de 40-50°C para a MC e de 75-90°C para o HPMC [127]. Um outro exemplo de polímero com um comportamento similar é o xiloglucano, derivado das sementes de tamarindo, que forma géis termossensíveis em água, em concentrações entre 1 e 2% (m/m) [98,127,128,129].

Este tipo de polímeros apresenta um equilíbrio muito sensível entre as interações hidrofóbicas-hidrofílicas que se estabelecem entre a rede polimérica e o meio aquoso [127]. Uma pequena mudança na temperatura ambiente, próxima da denominada “temperatura crítica”, característica de cada polímero, provoca novos ajustamentos nas interações hidrofílicas e hidrofóbicas entre as cadeias poliméricas e o meio aquoso [8,107,109,127]. Desta forma, uma das propriedades mais importantes deste tipo de polímeros é a temperatura crítica de solução. A temperatura crítica de solução é a temperatura à qual o polímero sofre separação de fases [127]. Se o sistema polimérico tem uma temperatura crítica de solução inferior (LCST), o aumento da temperatura envolvente acima da LCST torna as pontes de hidrogénio existentes entre as moléculas de água e a rede polimérica desfavoráveis. Este facto promove a desidratação da rede polimérica, verificando-se um fortalecimento dos segmentos hidrofóbicos e a agregação

das cadeias poliméricas, tornando o polímero hidrofóbico e insolúvel, ocorrendo a separação de fases e a formação de um gel [8,79,95-98,102,107,109,112,116,120,121,127,130,131]. Quando na presença de temperaturas abaixo da LCST, as pontes de hidrogénio existentes entre os segmentos hidrofílicos da rede polimérica e a água proporcionam um aumento da dissolução do sistema. Podemos assim classificar um polímero de LCST se é monofásico abaixo de uma determinada temperatura (temperatura crítica de solução) e bifásico acima desta mesma temperatura. Uma característica importante é o facto do aumento da concentração de polímero diminuir a temperatura a que ocorre a transição sol-gel, uma vez que as interações poliméricas hidrofóbicas ocorrem de forma mais rápida [127]. Por outro lado, um polímero classifica-se de USCT (temperatura crítica de solução superior) se é monofásico acima de uma determinada temperatura e bifásico abaixo dessa mesma temperatura [116].

Os polímeros com LCST são os polímeros mais utilizados nos sistemas farmacêuticos, isto porque permitem a completa dissolução do fármaco na solução polimérica a temperaturas inferiores à LCST, tornando, por exemplo, possível a sua injeção no corpo humano, gelificando no local onde é injetado [8,85,98,103,109,116,120,127,132]. Assim, forma-se um pequeno depósito, uma vez que, na presença de temperaturas superiores à LCST (temperatura corporal) ocorre a transição de fase sol-gel, modulando desta forma a libertação do fármaco veiculado [8,85,98,103,109,116,120,127,132]. Outro grande exemplo da utilização deste tipo de polímeros é o facto de poderem ser utilizados para vetorizar e potenciar a acumulação de agentes quimioterapêuticos em tumores sólidos. A aplicação de estímulos externos como o calor (entre os 37°C e os 42°C - temperatura aprovada para uma hipertermia clínica suave), a luz ou os ultrassons, aliada à presença de estímulos internos intrínsecos do ambiente tumoral (temperatura ligeiramente superior em relação à temperatura corporal, valores de pH mais baixos localizados entre os 6 e os 7,2 devido à baixa concentração de oxigénio, provocando altas concentrações de ácido láctico e outros metabolitos ácidos e a sobreexpressão de proteases) promovem a acumulação destes sistemas poliméricos nos tecidos tumorais [131,132]. Alia-se a estes factos, o aumento da permeabilidade e da retenção da rede vascular tumoral, permitindo a acumulação destes sistemas farmacêuticos no ambiente tumoral [132].

São vários os exemplos de polímeros sintéticos sensíveis à temperatura, destacando-se a família dos polímeros *poly(N-substituted acrylamide)*, entre aos quais são de realçar os polímeros: *poly(N-isopropylacrylamide)* (PNIPAAm) com um LCST próximo da temperatura corporal, ou seja 32°C; o *poly(N,N-diethylacrylamide)* (PDEAAm) com um LCST que varia entre os 26-35°C; o *poly(dimethylaminoethyl methacrylate)*

(PDMAEMA) com um LCST de 50°C e o *poly(N-(L)-(1-hydroxymethyl)propylmethacrylamide)* (P(L-HMPMA)) com um LCST de 30°C [109,119,121,133].

O polímero PNIPAAm é um polímero sintético sensível à temperatura, sendo o polímero mais estudado e utilizado na libertação de fármacos e em biomateriais [18,127]. Este polímero é solúvel em água à temperatura ambiente, uma vez que predominam as pontes de hidrogénio entre os grupos amina do polímero e as moléculas de água [127]. A temperaturas próximas da temperatura corporal, superiores a 32°C (LCST), ocorre a transição de fase devido à quebra das pontes de hidrogénio existentes, sendo as moléculas de água expelidas da rede polimérica, o que provoca a desidratação do polímero, predominando as interações hidrofóbicas entre as cadeias poliméricas, ocorrendo por consequência, a gelificação do sistema polimérico [98,103,109-111,121,127,133]. A adição de monómeros de natureza distinta pode alterar o equilíbrio hidrófilo/lipófilo existente no PNIPAAm, podendo provocar alterações na temperatura de transição de fase [127].

Outro grande grupo de polímeros sintéticos sensíveis à temperatura são aqueles que são compostos por blocos co-poliméricos. Entre os mais importantes destacam-se o os triblocos de co-polímeros polioxietileno-polioxipropileno-polioxietileno (PEO-PPO-PEO) (destacando-se os Poloxamers®), o tribloco polietilenoglicol-ácido polilático-polietilenoglicol (PEG-PLA-PEG), o polietilenoglicol/ácido polilático-co-glicólico (PEG/PLGA, Regel®) e o polioxietileno/polioxipropileno (PEO/PPO) [108,110]. Destes blocos de co-polímeros destacam-se os Poloxâmeros, uma vez que, originam hidrogéis de alta viscosidade que podem ser uma excelente estratégia para a libertação modificada de fármacos [134].

#### 1.2.4.1.2.4 Polímeros sensíveis ao pH

O valor de pH nos tecidos do corpo humano saudável situa-se em torno dos 7,4, existindo mecanismos que asseguram que o mesmo não sofre grandes variações. Apesar disto, existem órgãos, tecidos ou compartimentos celulares que apresentam valores de pH distintos. Ao longo do trato gastrointestinal existem variações no pH, atendendo a que o valor do pH no estômago se situa entre 1-3 e no intestino ronda valores de 7 [85]. Nos lisossomas, e devido ao contínuo bombeamento de prótons para dentro destes organelos celulares, o valor do pH situa-se em torno dos 5 [85]. Estas

variações dos valores de pH podem ser aproveitadas para direcionar agentes terapêuticos para uma determinada zona do nosso corpo, tecido ou compartimento celular.

Os polímeros sensíveis ao pH são polieletrólitos, com valores de pKa entre os 3 e os 10, que possuem na sua estrutura grupos ácidos ou básicos fracos que podem aceitar ou libertar prótons em resposta a mudanças do pH do meio ambiente onde se encontram [8,89,104,106,107,109,111,113,120,121]. Estes polímeros possuem na sua estrutura grupos ácidos (carboxilo ou sulfonato) e grupos básicos (sais de amónio – grupos amina) fracos que exibem alterações no estado de ionização em função das alterações nos valores de pH do meio ambiente circundante [8,89,107,109,121].

O comportamento deste tipo de polímeros, não só em termos de intumescimento, como também em termos de conformação e solubilidade, é influenciado pelo número e pela natureza dos grupos ionizáveis, pela composição do polímero e pela densidade de ligações cruzadas [8,85,89,109].

Os polímeros sensíveis ao pH classificam-se em dois grandes grupos, de acordo com os grupos funcionais que apresentam na sua estrutura. Assim, existem os polímeros sensíveis ao pH designados por poliácidos ou polianiões (compostos por grupos funcionais ácidos como por exemplo o ácido poliacrílico (PAA) designado comercialmente como Carbopol® e o ácido polimetacrílico (PMAA)) e as polibases ou policatiões (compostos por grupos funcionais básicos como o por exemplo o *poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate)* (PDMAEMA), o *poly(N,N-diethylaminoethyl methacrylate)* (PDEAEMA), a poli-L-lisina (PLL), o *poly(ethylenimine)* (PEI), o *poly(4-vinylpyridine)*, o *poly(2-vinylpyridine)* (designados PVP) e o *poly(vinylamine)* (PVAm) [8,107,109,121].

Os polímeros sensíveis ao pH designados por poliácidos ou polianiões apresentam na sua estrutura grupos ácidos ionizáveis que aceitam prótons na presença de valores de pH baixo e libertam prótons na presença de valores de pH elevados (neutros ou alcalinos). Assim, este tipo de sistema polimérico retém o fármaco veiculado na presença de ambientes com valores de pH ácido (ex. estômago), libertando o fármaco veiculado na presença de ambientes alcalinos (ex. intestino delgado) [107,113,121]. A libertação do fármaco para o meio envolvente ocorre devido à ionização dos grupos ácidos, provocando o intumescimento da matriz polimérica devido às repulsões eletrostáticas entre os grupos ionizados [113].

Por outro lado, os polímeros sensíveis ao pH designados por polibases ou policatiões apresentam na sua estrutura grupos básicos. Na presença de um ambiente neutro ou alcalino, os grupos amina primários, secundários e terciários encontram-se no estado não ionizado, retendo as moléculas de fármaco no seu interior. Contudo, quando

o valor do pH circundante baixa para valores abaixo do valor do pKa destes grupos amina (ex. estômago), estes grupos tornam-se protonados e a rede polimérica intumescce devido às repulsões eletrostáticas que se verificam entre os grupos carregados positivamente, libertando desta forma as moléculas de fármaco para o meio envolvente [8,113,121].

Para que a libertação do fármaco veiculado neste tipo de sistema farmacêutico ocorra numa determinada zona, órgão ou tecido do corpo humano, a transição de fase sol-gel do sistema polimérico tem que ocorrer no valor de pH específico que se verifica no alvo terapêutico, limitando assim os potenciais efeitos secundários do fármaco veiculado. São vários os polímeros naturais (exemplos: quitosano, albumina e gelatina) que demonstram ter sensibilidade às mudanças do pH do ambiente circundante [22].

Sendo assim, são várias as possíveis aplicações deste tipo de polímeros. Devido às características físico-químicas muito específicas existentes nos tumores sólidos (hipóxia, acumulação de metabolitos ácidos, verificando-se baixos valores de pH extracelular entre 6,2 e 7,2, baixa pressão sanguínea e rede capilar mal formada apresentando uma maior permeabilidade) a utilização deste tipo de sistemas poliméricos poderá ser uma alternativa muito vantajosa de forma a aumentar a vetorização e consequentemente a eficácia terapêutica, minimizando os efeitos secundários [85,131,132,135].

Por outro lado, as moléculas de ácido nucleico usadas como agentes terapêuticos têm demonstrado um grande potencial no tratamento contra o cancro e no tratamento de doenças neurodegenerativas. No entanto, a introdução deste tipo de moléculas com carga negativa e de grandes dimensões no interior das células não é uma tarefa fácil [103]. A eficácia deste tipo de terapêutica depende da sua habilidade para atingir os seus alvos intracelulares [113]. A administração sistémica de moléculas de ácido nucleico terapêutico apresenta várias desvantagens, destacando-se a degradação por enzimas denominadas nucleases, a distribuição não específica pelo corpo, a eliminação rápida pela urina e um *uptake* celular muito limitado através da endocitose. Os polímeros polieletrólitos catiónicos, também designados *polyplexes*, apresentam um elevado potencial no transporte de moléculas de carga oposta (ex. DNA) para o interior das células tirando partido dos mecanismos e características específicas da endocitose [89,131]. A encapsulação das moléculas de DNA na rede polimérica catiónica protege as moléculas de DNA durante a circulação sistémica e permite a interação com a superfície das células que se encontram carregadas negativamente, promovendo desta forma a endocitose [89]. O potencial redutor e o pH ácido que se verifica no interior das vesículas endossomais e nos compartimentos lisossomas intracelulares, proporcionam uma excelente oportunidade para explorar a distribuição específica dos fármacos [131].



Durante a endocitose, o valor de pH no endossoma situa-se entre os 5 e os 6, fundindo-se com o pré-lisossoma segregado pelo complexo de Golgi, formando um lisossoma. O lisossoma possui diversas enzimas digestivas, incluindo as enzimas nucleases (capazes de destruir a molécula de DNA veiculada). Com o objetivo de transportar o DNA para o núcleo, e de forma a que a molécula de DNA veiculada não seja destruída pelas nucleases, o DNA terá que escapar do endossoma antes que ocorra a fusão lipossomal [113]. O compartimento endossomal apresenta na sua membrana bombas de prótons ATP dependentes que, acidificam o ambiente endossomal para valores de pH de 5 [113]. A endocitose deste tipo de sistemas poliméricos catiónicos resulta num tamponamento do pH endossomal, promovendo a entrada de iões de hidrogénio para o interior do endossoma e a saída de contra-íões (ex. os iões cloreto), aumentando desta forma a pressão osmótica endossomal. O gradiente osmótico formado causa a entrada de água para o endossoma, provocando a ruptura da membrana endossomal e a consequente libertação das moléculas de DNA para o citoplasma, podendo este exercer a sua função no alvo terapêutico [89,110,113].

Outro exemplo da possível utilização de polímeros sensíveis ao pH é no tratamento da Diabetes Mellitus do tipo I (doentes insulín dependentes). Uma terapia considerada ideal tem que manter os níveis de glucose na corrente sanguínea em patamares normais ao longo de todo o dia e, idealmente, sem recorrer às constantes medições dos níveis de glucose e sem recorrer à injeção repetida de doses de insulina. Assim, surgiram os polímeros sensíveis à glucose, que são constituídos por polímeros inteligentes sensíveis ao pH com enzimas imobilizadas (exemplo: glucose oxidase e catalase). A glucose oxidase, existente nestes sistemas poliméricos, oxida a glucose existente na corrente sanguínea, formando ácido glucorónico, causando uma alteração no pH envolvente, baixando-o [85,89,95,107,109,112,121]. Esta redução do valor do pH no meio envolvente ao sistema polimérico sensível ao pH provoca alterações conformacionais no sistema (protonação dos grupos ácidos ionizáveis causando repulsões eletrostáticas entre os grupos ionizados, levando ao intumescimento da matriz polimérica), promovendo a libertação da insulina veiculada [85,89,95,107,109,112,121]. A utilização da catalase neste tipo de sistema polimérico tem por objetivo promover a conversão do peróxido de hidrogénio em oxigénio, o qual é necessário para que ocorra a oxidação da glucose [107].

#### 1.2.4.1.2.5 Polímeros sensíveis à força iónica

Os polímeros sensíveis a forças iónicas sofrem transição de fase sol-gel em resposta a alterações na concentração de eletrólitos existentes em diferentes locais, tecidos ou órgãos do corpo humano [94,136-139]. Este tipo de polímeros estabelece interações iónicas, principalmente entre as cargas negativas do polímero e os catiões existentes no meio circundante [29,94,137,139-141]. A título de exemplo, o fluido lacrimal é constituído por um conjunto de eletrólitos, principalmente catiões mono e bivalentes  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , que estabelecem assim interações iónicas com os polímeros sensíveis a forças iónicas, promovendo a transição de fase solução-gel [77,94,136-139]. Assim, estes sistemas poliméricos utilizados em formulações oftálmicas tópicas ao entrarem em contacto com os eletrólitos do fluido lacrimal gelificam, aumentando a viscosidade da formulação e o tempo de contacto da formulação na zona pré-corneal, sendo esta gelificação proporcional à quantidade de catiões existentes [29,40,77,94,138-142]. Os polímeros sensíveis a estímulos mais utilizados em formulações farmacêuticas são o alginato de sódio e a goma gelana desacetilada (Gelrite®).

A goma gelana é um polissacarídeo aniónico segregado por bactérias Gram negativas (*Pseudomonas* e *Auromonas elodea*), é biocompatível, bem tolerada pelos tecidos oculares, com propriedades bioadesivas, sofrendo transição sol-gel reversível dependente da força iónica do meio circundante, sendo esta gelificação proporcional à quantidade de catiões mono e bivalentes existentes no meio circundante [21,29,40,77,94,138-142]. De facto, estabelecem-se interações iónicas entre as cargas negativas do polímero e os catiões mono e bivalentes existentes no fluido lacrimal [29,94,77,137,139-141]. Carlfors *et al.* (1998) [143] prepararam hidrogéis de Gelrite® (nome comercial da goma gelana desacetilada) com uma concentração entre 0,4 e 1,2% (m/m). A elasticidade dos hidrogéis preparados com a Gelrite® aumenta com o aumento da concentração dos eletrólitos, sendo independente da concentração de Gelrite® utilizada. Noutro estudo foi demonstrado que 0,1% (m/m) de Gelrite® é suficiente para gelificar quando em contacto com o fluido lacrimal, sendo que concentrações de Gelrite® entre 0,5 e 1% (m/m) necessitam somente de 10 a 25% dos iões presentes no fluido lacrimal para gelificar [141]. Da mesma forma, Balasubramanian *et al.* (2003) [48] prepararam hidrogéis de Gelrite® (0,1 e 0,5%, m/m) veiculando a indometacina (1%, m/m), sendo que estes proporcionaram uma libertação prolongada de pelo menos 8 horas (tempo do estudo *in vitro*) e um efeito terapêutico de 24 horas evidenciado pelos estudos *in vivo*.

O alginato de sódio é outro polímero aniônico sensível à força iônica, mucoadesivo, biodegradável e biocompatível, utilizado em formulações oftálmicas, uma vez que gelifica ao entrar em contacto com catiões bivalentes como o  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ , existentes na superfície ocular e no fluido lacrimal, produzindo um gel incolor e translúcido [21,25,30,]. A gelificação do alginato de sódio ocorre por gelificação ionotrópica principalmente devido à presença no meio circundante de catiões bivalentes e na presença de valores de pH superiores a 6 [21]. Os investigadores Trinquand *et al.* (2003) [144] prepararam hidrogéis de alginato de sódio (3%, 4% e 5%, m/m) veiculando o diclofenac de sódio, tendo verificado uma libertação prolongada de fármaco por mais de 6 horas, chegando a 9 horas no caso do hidrogel preparado com 5% (m/m) de polímero. Noutro estudo, Ahuja *et al.* (2008) [145] prepararam um hidrogel de alginato de sódio e HPMC veiculando o cloridrato de moxifloxacina, tendo verificado uma libertação prolongada do fármaco por mais de 10 horas, um aumento do tempo de residência ocular da formulação, além de não terem verificado nenhum indício de toxicidade nos estudos *in vivo*.

#### 1.2.4.1.2.6 Sistemas poliméricos sensíveis a mais do que um estímulo

A associação de polímeros que respondem a diferentes estímulos no mesmo sistema farmacêutico apresenta-se como uma alternativa viável com o intuito de melhorar a vetorização dos fármacos veiculados para um determinado alvo terapêutico, aumentando assim a eficácia terapêutica e diminuindo drasticamente os efeitos secundários. Assim, a criação de um sistema polimérico constituído por polímeros que respondem a diferentes estímulos tirando partido das diferentes características físico-químicas específicas do alvo terapêutico, promove a libertação direccionada do(s) fármaco(s) veiculados no alvo terapêutico. A seletividade deste tipo de sistemas farmacêuticos proporciona uma redução da dose a administrar, a diminuição do número de administrações diárias e uma consequente adesão à terapêutica. O futuro aponta para a criação de redes poliméricas capazes de detetar parâmetros bioquímicos alterados ou capazes de responder à presença de certas biomoléculas, libertando em consequência o fármaco veiculado.

Aliar redes poliméricas constituídas por polímeros que respondam a estímulos específicos a transportadores coloidais de forma a retirar partido das vantagens destas duas estratégias, é algo que deve ser explorado com afinco, uma vez que os resultados dos primeiros estudos demonstram ser um caminho muito promissor.

#### 1.2.4.1.2.7 Polímeros sensíveis a estímulos utilizados em formas farmacêuticas para uso oftálmico

A reduzida eficácia terapêutica das formulações oftálmicas convencionais devido à rápida eliminação da superfície ocular pode ser ultrapassada com a utilização de polímeros sensíveis a estímulos [29,30,44,48,71,79]. Os polímeros sensíveis a estímulos que podem ser utilizados nas formulações oftálmicas são os polímeros termossensíveis, os polímeros sensíveis ao pH e os polímeros sensíveis à força iónica [16,18,31,44,48,70]. Os hidrogéis oftálmicos de aplicação tópica preparados com polímeros sensíveis a estímulos após entrarem em contacto com os tecidos oculares sofrem transição de fase reversível sol-gel [15,16,18,19,29,30,44,48,71,79,84,91,117]. Ou seja, este tipo hidrogéis, na presença das características físico-químicas específicas do globo ocular (temperatura, pH, força iónica resultante da composição eletrolítica do fluido lacrimal) aumentam a sua viscosidade e as propriedades mucoadesivas, proporcionando o aumento da biodisponibilidade do fármaco oftálmico através do aumento do tempo de residência nos tecidos oculares [11,18,19,31,84,85,91-94,136,137]. Os hidrogéis oftálmicos preparados com polímeros sensíveis a estímulos apresentam como vantagens, o facto de apresentarem uma libertação prolongada do fármaco veiculado no saco conjuntival quando comparados com as formulações oftálmicas convencionais [29,31,91].

A Tabela I apresenta alguns exemplos de polímeros sensíveis a estímulos que podem ser utilizados em formulações oftálmicas tópicas.

**Tabela I.** Exemplos de polímeros sensíveis a estímulos que podem ser utilizados em formulações oftálmicas tópicas.

Polímeros termossensíveis	Polímeros sensíveis ao pH	Polímeros sensíveis à força iónica
Poloxâmeros	Quitosano	Alginato de sódio
Derivados da cellulose	Carbómeros	Goma gelana desacetilada (Gelrite <sup>®</sup> )
Polimetacrilatos	Policarbofilo (PCP)	
Xiloglucano	Acetofalato de cellulose	
Poli(N-isopropilacrilamida)(PNIPAAm)		

Estes hidrogéis devem apresentar um comportamento reológico não Newtoniano pseudoplástico, causando assim o mínimo de influência no pestanejar, reduzindo o desconforto resultante da administração tópica da preparação oftálmica [71]. De acordo com algumas publicações científicas, a viscosidade das formulações preparadas contendo estes polímeros deve situar-se entre 5-1000 mPas antes da gelificação,

devendo apresentar uma viscosidade entre 50-50000 mPas, depois de entrar em contacto com os tecidos oculares e sofrer transição de fase sol-gel [38].

As formulações oftálmicas preparadas com este tipo de polímeros, quando comparadas com as formulações preparadas com agentes viscosificantes, apresentam várias vantagens, entre as quais se destaca o facto de poderem ser administradas quantidades precisas e reprodutíveis de formulação [19,63]. Esta propriedade está relacionada com o facto das formulações preparadas com polímeros sensíveis a estímulos, aquando da sua administração, estarem no estado líquido não viscoso, ao contrário das formulações preparadas com agentes viscosificantes, que ao apresentarem elevada viscosidade dificultam a administração repetida das mesmas quantidades de formulação.

Nos últimos anos, vários investigadores têm associado com sucesso na mesma formulação diferentes polímeros que respondem a estímulos distintos, de forma a aproveitar as diferentes características físico-químicas específicas dos tecidos oculares [19,84]. Desta forma, a associação na mesma formulação de polímeros termossensíveis, polímeros sensíveis ao pH e/ou polímeros sensíveis à força iónica, pode levar a um aumento da biodisponibilidade ocular do fármaco, quando comparada com uma formulação que só é constituída por um único tipo de polímero sensível a um estímulo [19,84]. Aproveitam-se assim as diferentes características físico-químicas intrínsecas dos tecidos oculares com o objetivo de provocar a transição de fase sol-gel imediatamente após o contacto com a superfície ocular e por conseguinte aumentar a eficácia terapêutica da formulação [15].

#### 1.2.4.1.2.7.1 Polímeros termossensíveis

O tratamento da maioria das patologias oculares é passível de ser conseguido com a administração de colírios. A administração deste tipo de formulações é fácil e como não é invasiva verifica-se uma grande adesão à terapêutica.

Tendo como ponto de partida que os tecidos oculares apresentam uma temperatura superficial de 34-35°C, depreende-se que é possível utilizar polímeros sensíveis à temperatura em formas farmacêuticas líquidas, como os colírios, sendo fáceis de preparar e formular, as quais após serem administradas e ao entrarem em contacto com a temperatura ocular gelificam, aumentando o tempo de residência ocular e a biodisponibilidade do fármaco veiculado. Dos vários polímeros termossensíveis utilizados em preparações oftálmicas destacam-se os poloxâmeros.

#### 1.2.4.1.2.7.1.1 Poloxâmeros

Os poloxâmeros são triblocos co-poliméricos anfifílicos não iónicos baseados em sequências polioxietileno-polioxipropileno-polioxietileno ( $\text{PEO}_n\text{-PPO}_n\text{-PEO}_n$ ), comercializados com os seguintes nomes: Pluronic<sup>®</sup>, Poloxamers<sup>®</sup> e Tetronics<sup>®</sup>, utilizados como aditivos alimentares e na preparação de formas farmacêuticas [8,69,79,107,109,117,120,124,130,146-161]. Estes polímeros, quando em solução, formam veículos hidrófilos de alta viscosidade que podem ser utilizados para preparar sistemas farmacêuticos de libertação modificada de fármacos [158,162]. De realçar o facto da Farmacopeia Portuguesa 9.0 apresentar uma monografia específica para os poloxâmeros [3].

#### 1.2.4.1.2.7.1.2 Características gerais e propriedades dos poloxâmeros

Os poloxâmeros são polímeros não iónicos baseados em sequências PEO-PPO-PEO ( $\text{PEO}_n\text{-PPO}_n\text{-PEO}_n$ ), biocompatíveis e biodegradáveis, não tóxicos, compostos por grânulos brancos, de origem cerosa, com um bom escoamento, solúveis em água, praticamente sem odor ou paladar [8,109,117,120,121,134,146-149,151-154,158-164]. Além destas características, os poloxâmeros são capazes de aumentar a solubilidade aquosa e a estabilidade dos fármacos veiculados [156]. Os poloxâmeros, tal como outros tensioativos, quando dispersos num líquido a baixas concentrações, formam micelas monomoleculares, mas quando a concentração do poloxâmero no sistema aumenta, formam-se agregados multimoleculares [158,165]. Acima da temperatura crítica de gelificação, estas soluções poliméricas apresentam um comportamento de micelinização termossensível formando hidrogéis, ou seja, as micelas organizam-se numa rede cristalina [8,19,79,107,109,120,124,130,158,159]. O polioxipropileno (PPO) forma o núcleo central hidrófobo em que os grupos metílicos interatuam através de forças de van der Waals com as substâncias, solubilizando-as [8,19,109,120,158,166]. Estes núcleos centrais hidrófobos das micelas atuam como reservatórios de fármacos hidrófobos, enquanto as camadas hidrófilas na interface entre os núcleos hidrófobos das micelas e o solvente estabilizam as micelas [156]. Acredita-se assim, que a solubilidade dos poloxâmeros na água é devido ao polioxietileno (PEO) que estabelece pontes de hidrogénio com as moléculas da água [8,109,120,159,166]. Esta característica faz dos poloxâmeros importantes excipientes que podem ser utilizados para aumentar a

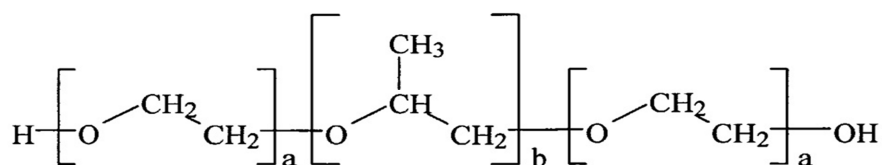
estabilidade e a solubilidade de fármacos pouco solúveis em água e nos fluidos biológicos [166].

Os poloxâmeros estão disponíveis em diferentes formas físicas e massas moleculares [19,117,147,153,156,158,160]. A apresentação física do polímero é designada por letras no nome comercial, assim, a designação “F” refere-se à apresentação física do polímero na forma de flocos, a designação “P” refere-se à apresentação do polímero na forma de pasta, enquanto a designação “L” refere-se à apresentação do polímero na forma líquida. Os Poloxamers® que são normalmente usados em formas farmacêuticas são: o 188 (F-68); o 237 (F-87); o 338 (F-108) e o 407 (F127) [29,117,158].

Quando em concentrações adequadas apresentam uma temperatura de transição sol-gel próxima da temperatura corporal [8,107,109,121,151,167,168]. A temperatura de transição sol-gel deste tipo de polímero depende não só da composição do polímero, como também da sua concentração em solução [109,149,150].

#### 1.2.4.1.2.7.1.3 Pluronic® F-127

O Pluronic® F-127 (PF 127) (PEO<sub>106</sub>-PPO<sub>70</sub>-PEO<sub>106</sub>) ou Poloxâmero 407 é um polímero com um peso molecular de 12000 Daltons, contendo 70% de óxido de etileno (fundamental para o seu carácter hidrófilo), com uma proporção PEO/PPO de 2:1, apresentando baixa viscosidade a 4°C, formando um gel semissólido à temperatura corporal [121,127,134,169-172].



**Figura 4.** Estrutura química do Pluronic® F-127.

O PF 127 apresenta assim um particular interesse porque apresenta um perfil de toxicidade muito baixo e em soluções aquosas com uma concentração entre 20-30% (m/m), transita de uma solução transparente de baixa viscosidade, para um gel semissólido quando entra em contacto com a temperatura corporal, sendo esta transição reversível na presença de baixas temperaturas [69,70,121,127,134,147,161,169,173-176].

Este comportamento termorreversível deve-se às interações entre os diferentes segmentos que compõem o bloco polimérico [177]. Assim, o aumento da temperatura modifica as esferas de hidratação em torno das unidades hidrófobas, o que torna mais forte as interações entre estas unidades [71,103,178]. Quando se verifica o aumento de temperatura na solução aquosa de PF 127, verifica-se a dessolvatação gradual do polímero, aumentando a agregação micelar [71,103,154,156,178]. Assim, a formação das micelas deve-se ao facto dos blocos PPO desidratarem e formarem um núcleo com uma camada externa de cadeias PEO hidratadas, formando micelas esféricas, sendo que a dado ponto as micelas entram em contacto umas com as outras, deixando-se de movimentar [71,103,154,156,178]. A estrutura micelar deste tribloco polimérico em meio aquoso pode ser utilizada para incorporar fármacos hidrófilos e hidrófobos, promovendo a libertação prolongada do fármaco veiculado [159,172].

A gelificação termorreversível faz com que este polímero seja alvo de muito interesse na administração de fármacos. Conclui-se que, neste caso, a libertação de fármacos faz-se por difusão e dissolução através do hidrogel que se forma [90,109,179]. Ricci *et al.* (2005) [151] demonstraram que o coeficiente de difusão de um fármaco (lidocaína) a partir da matriz de um hidrogel de Poloxâmero 407 (P 407) diminui quando se aumenta a concentração deste polímero no sistema farmacêutico, coincidindo com o aumento da viscosidade do hidrogel [151,179]. Estes investigadores concluíram que o tempo de dissolução aumenta, diminuindo a difusão do fármaco através da matriz do hidrogel [151,179]. Além da viscosidade, a temperatura a que o hidrogel está sujeito, influencia a taxa de libertação do fármaco [179]. Assim, conclui-se que a concentração do polímero na solução afeta não só o comportamento reológico do hidrogel como também o coeficiente de difusão e o tempo de dissolução do fármaco veiculado [19,179].

Um facto bastante importante neste tipo de sistemas poliméricos foi reportado por vários investigadores que demonstraram que alguns fármacos, sais, tensioativos, polímeros e co-solventes provocam alterações na formação de micelas, turvação e solubilização de soluções de Pluronic® [19,107,180-183]. A adição deste tipo de compostos, muitas vezes imprescindíveis à forma farmacêutica, permitem ajustar a temperatura de transição sol-gel, desenvolvendo sistemas farmacêuticos termossensíveis únicos, sendo que estes compostos podem também influenciar o coeficiente de dissolução do fármaco no gel, influenciando desta forma, o perfil de liberação do fármaco [180]. A temperatura de gelificação é determinada pelo equilíbrio entre os segmentos hidrófilos-hidrófobos, sendo que a incorporação de cadeias ou segmentos poliméricos hidrófilos ou hidrófobos vai promover a alteração da temperatura de gelificação da solução de PF 127 [107]. Por estas razões, aquando dos estudos de pré-formulação, é



fundamental avaliar a influência destes compostos no comportamento do hidrogel, não só em termos reológicos, como também na temperatura de transição sol-gel e no perfil do fármaco libertado [180,181,184,185]. A título de exemplo, Pandit e Kisaka (1996) [180] estudaram a influência dos sais NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub> e Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>, concluindo que estes promoveram a diminuição da temperatura de transição sol-gel, sendo esta diminuição proporcional à concentração do sal na solução polimérica. Da mesma forma, Pandit e Wang (1998) [181] demonstraram que a adição de NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> e CaCl<sub>2</sub> promoveu uma redução no coeficiente de difusão e por consequência na taxa de libertação do fármaco (propanolol), sendo esta diminuição dependente da natureza do sal e da sua concentração na rede polimérica. Por outro lado, Leszczyńska *et al.* (2011) [172] demonstraram que a adição de agentes isotónicos (manitol, sorbitol e cloreto de sódio) ou a adição de agentes viscosificantes (hidroxipropilmetilcelulose, metilcelulose, carboximetilcelulose de sódio) promoveram um aumento na viscosidade nas formulações de PF 127, contribuindo desta forma, para a redução da taxa de libertação de fármaco.

São variados os estudos que têm sido feitos relacionados com a aplicação deste polímero em sistemas de libertação modificada de fármacos, entre eles, destacam-se a administração oral (ex. corticosteróides), oftálmica (ex. anti-inflamatórios, antibióticos, antifúngicos, tratamento do glaucoma), retal (ex. anti-inflamatórios, analgésicos, quinina para o tratamento da malária), tópica para a gestão da dor, tratamento de queimaduras e cicatrização de feridas ou tratamento de infeções (ex. anti-inflamatórios, analgésicos, antifúngicos e anticancerígenos), administração intranasal (ex. anti-inflamatórios, analgésicos, hipertensão), intramuscular, percutânea e subcutânea sob a forma de injetável (ex. hormona de crescimento humano recombinante, antibióticos, anti-inflamatórios, analgésicos e anestésicos) [19,34,71,79,98,108,109,121,134,149-153,160,161,163,164,173,177,182,184-214]. Em todos estes estudos, o hidrogel de PF 127 foi descrito como um bom veículo, promovendo o aumento da estabilidade físico-química do fármaco veiculado, a diminuição da taxa de libertação do fármaco e, desta forma, o prolongamento da atividade farmacêutica, aumentando a eficácia terapêutica e a diminuição dos efeitos secundários.

O PF 127 é um poloxâmero muito utilizado em formulações oftálmicas, uma vez que, gelifica a temperaturas inferiores à temperatura ocular, formando um gel transparente com propriedades mucomiméticas, podendo ser utilizado como substituto do fluido lacrimal além de não apresentar toxicidade para os tecidos oculares [11,63]. A gelificação de uma solução de poloxâmero é muito dependente da concentração. Para que esta ocorra imediatamente após entrar em contacto com a temperatura da mucosa

ocular (34-35°C) é necessário ajustar a concentração de poloxâmero na solução, uma vez que, após a administração oftálmica do hidrogel de poloxâmero, ocorre uma diluição no fluido lacrimal e sendo assim é necessário aumentar a concentração de poloxâmero na formulação oftálmica [79-155].

Concentrações de poloxâmero superiores a 20% (m/m) podem provocar irritação dos tecidos oculares [19,63,155]. Para reduzir a concentração final de poloxâmero no hidrogel oftálmico, vários investigadores combinaram o poloxâmero com agentes viscosificantes ou com polímeros sensíveis a diferentes estímulos (polímeros sensíveis ao pH ou polímeros sensíveis à presença de certos eletrólitos do fluido lacrimal) [71,124,128,129,153,165,172,177,205,206,210,211,213,215,216]. O agente viscosificante a utilizar em formulações oftálmicas com PF 127 deve ser escolhido em função da viscosidade, do comportamento reológico, da mucoadesividade e da molhabilidade [165,172,205,215,216]. A adição de, por exemplo, metilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, carboximetilcelulose sódica, Carbopol® 940, goma xantana ou alginato de sódio a um hidrogel de PF 127, promove uma redução da concentração necessária de poloxâmero, aumentando não só a viscosidade como também a mucoadesividade do hidrogel, promovendo desta forma a retenção da formulação na zona pré-corneal [19,71,124,165,215-217].

A Tabela II apresenta alguns exemplos da utilização de poloxâmeros em formulações oftálmicas tópicas.

**Tabela II.** Exemplos da utilização de poloxâmeros em formulações oftálmicas tópicas.

Formulação Oftálmica	Resultados	Referência
Preparação e comparação do desempenho de hidrogéis de PF 127 com hidrogéis de xiloglucano contendo cloridrato de pilocarpina.	- O hidrogel de xiloglucano (1,5% m/m) e o hidrogel de PF 127 (25% m/m) apresentaram o mesmo desempenho no que se refere à libertação prolongada de cloridrato de pilocarpina e no aumento da resposta mitótica após administração em coelhos.	[128]
Hidrogel preparado com diferentes concentrações de PF 127 (15, 20 e 25%, m/m) contendo maleato de timolol.	- Ao hidrogel de PF 127 15% foram adicionados diferentes agentes viscosificantes (HPMC, MC e carboximetilcelulose sódica (CMC Na)). - O hidrogel com PF 127 15% com 3% de metilcelulose apresentou uma taxa de libertação de fármaco mais baixa. - Estudos <i>in vivo</i> realizados com coelhos albinos demonstraram que a biodisponibilidade ocular do maleato de timolol aumentou 2,5 vezes no hidrogel com PF 127 25% e 2,4 vezes no hidrogel com PF 127 15% com 3% de metilcelulose quando comparadas com a solução aquosa contendo 0,5% de maleato de	[71]

	timolol.	
Preparação de um hidrogel de PF 127 e Pluronic® F 68 (PF 68) com o hialuronato de sódio (polissacarídeo mucoadesivo).	- De acordo com os resultados de cintigrafia gama a formulação com 21% de PF 127 e 10% de PF 68 gelificou ao entrar em contacto com os tecidos oculares, promovendo um aumento de três vezes no tempo de residência da formulação na zona pré-corneal quando comparada com uma solução de tampão fosfato.	[219]
Preparação e otimização de um hidrogel oftálmico contendo uma combinação de Poloxâmero 407 (P 407), Poloxâmero 188 (P 188) e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) ou hidroxietilcelulose (HEC), contendo cloridrato de ciprofloxacina.	- O aumento da concentração de P 407, HPMC e HEC promove o aumento da viscosidade e da mucoadesividade, tendo por consequência a diminuição da libertação <i>in vitro</i> do fármaco. - Os estudos <i>in vivo</i> realizados em coelhos albinos demonstraram que estas formulações apresentaram uma elevada mucoadesividade, além de uma libertação prolongada de fármaco, promovendo um aumento da biodisponibilidade ocular quando comparadas com a formulação existente no mercado.	[220]
Desenvolvimento de um hidrogel baseado numa mistura de diferentes poloxâmeros (15% m/m de PF 127; 10-15% m/m de PF 68) com ácido hialurónico (0,5-1% m/m) veiculando o aciclovir.	- A adição de ácido hialurónico promoveu um aumento das propriedades mucoadesivas do hidrogel baseado na mistura de poloxâmeros. - O hidrogel desenvolvido apresentou uma libertação prolongada de mais de seis horas do aciclovir.	[221]
Comparação do desempenho de três hidrogéis oculares diferentes: Carbopol® 940 e HPMC; PF 127 e HPMC; Gelrite®, veiculando o cloridrato de ciprofloxacina.	- As três formulações demonstraram ser estáveis, terapeuticamente eficazes, não irritantes e promoveram uma libertação modificada de cloridrato de ciprofloxacina de mais de 6 horas.	[222]
Preparação de um hidrogel de PF 127 com metilcelulose (MC) e cetorolac de trometamina.	- O hidrogel formulado com 15% de PF 127 e 2% de metilcelulose demonstrou ser a formulação com melhores características de gelificação. - O aumento da concentração de PF 127 e metilcelulose aumentou a capacidade de gelificação, promovendo uma libertação prolongada do fármaco de mais de cinco horas.	[124]
Hidrogel oftálmico preparado a partir de uma mistura de PF 127 (15-20% m/m) e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) (0,5, 1 e 1,5%, m/m) contendo cloridrato de dorzolamida e maleato de timolol.	- A formulação preparada com 15% de PF 127 e 1% de hidroxipropilmetilcelulose demonstrou ter as melhores características físico-químicas, elevada permeabilidade, promovendo também uma diminuição do número de administrações devido ao aumento da biodisponibilidade.	[217]
Otimização de um hidrogel oftálmico contendo PF 127 (16-22% m/m) e PF 188 (0-5% m/m) contendo hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPCD), veiculando a doxiciclina.	- O hidrogel preparado demonstrou ter uma temperatura de gelificação inferior à temperatura da superfície ocular após diluição em fluido lacrimal artificial. - A introdução de HPCD promoveu um aumento da estabilidade da formulação.	[223]
Preparação de um hidrogel oftálmico	- A formulação preparada promoveu uma libertação	[224]

preparado com PF 127 e HPMC K4M veiculando o hemihidrato de levofloxacina.	prolongada da levofloxacina por mais de 8 horas. - Foram efetuados ensaios <i>in vivo</i> com coelhos albinos, concluindo-se que a formulação preparada é uma excelente alternativa à existente no mercado, uma vez que promove um aumento da biodisponibilidade, através do aumento do tempo de residência pré-corneal, apresentando uma libertação prolongada do fármaco.
--	--

#### 1.2.4.1.2.7.2 Polímeros sensíveis ao pH

O valor de pH nos organelos celulares, tecidos e órgãos do corpo humano apresentam variações que podem ser aproveitadas para vetorizar fármacos e outros agentes terapêuticos [89,225]. Os tecidos oculares e o fluido lacrimal apresentam um valor de pH de 7,4. Os polímeros sensíveis ao pH podem ser aproveitados para vetorizar fármacos para os tecidos oftálmicos. Assim, uma formulação oftálmica de administração tópica preparada com este tipo de polímeros, ao entrar em contacto com o pH dos tecidos oculares deve sofrer uma transição de sol-gel reversível, aumentando desta forma a viscosidade e por conseguinte o tempo de residência pré-corneal [89,225]. Os polímeros sensíveis ao pH mais utilizados em formas farmacêuticas de aplicação tópica são o ácido poliacrílico (PAA), o ácido polimetacrílico (PMAA), o policarbofilo (PCP), o quitosano (CS) e o acetatoftalato de celulose (CAP) [15].

Polímeros poliácidos ou polianiões como o PAA ou como o PMAA, em ambiente ácido apresentam-se na sua forma líquida, gelificando com o aumento do pH circundante (neutro ou alcalino), libertando o fármaco veiculado [107,117,113,226]. Este tipo de polímeros também tem a capacidade de estabelecer interações eletrostáticas através de pontes de hidrogénio entre os grupos carboxilo do polímero e os grupos carboxilo do ácido siálico da mucina (glicoproteína existente na superfície ocular) [11,31]. Esta interação é tanto maior quanto maior for a concentração de mucina presente no globo ocular [11].

O Carbopol<sup>®</sup> é um tipo de polímero hidrossolúvel sensível ao pH que faz parte da família dos carbómeros, constituídos essencialmente por polímeros de elevado peso molecular, baseado no ácido poliacrílico (PAA), utilizados para estabilizar emulsões ou aumentar a viscosidade [107,225-227]. Existem vários tipos de Carbopol<sup>®</sup> (934P, 940, 974P, 1342P, etc.) que podem ser utilizados em aplicações oftálmicas, sendo que todos eles promovem o aumento da viscosidade da formulação quando em contacto com os

tecidos oculares, aumentando o tempo de residência pré-corneal da formulação [225,227,228].

Os hidrogéis oftálmicos preparados com elevadas concentrações de Carbopol® apresentam um valor de pH baixo, podendo desta forma danificar os tecidos oculares [30]. Tal como nos poloxâmeros, a concentração de carbômero utilizada deve ser reduzida com a adição de agentes viscosificantes, como por exemplo, os derivados da celulose [229]. Esta mistura não poderá interferir com as propriedades reológicas da formulação nem com a capacidade do Carbopol® em responder ao aumento do pH [229]. O valor de pH destas formulações deve ser o mais próximo possível dos 7,4, para que, ao entrar em contacto com os tecidos oculares, sofra uma transição de fase sol-gel imediata. Kumar e Himmelstein (1995) [229] prepararam um hidrogel oftálmico baseado numa mistura de Carbopol® e HPMC, conseguindo obter um hidrogel líquido, que imediatamente após entrar em contacto com o pH dos tecidos oculares gelifica no saco conjuntival promovendo uma libertação prolongada do maleato de timolol. Com o mesmo intuito, Srividya *et al.* (2001) [230] misturaram o Carbopol® 940 (0,2-0,5% m/m) com HPMC (Methocel® E50LV) (1-1,5% m/m) e com ofloxacina. Kumar *et al.* (1995) [231] combinaram o Carbopol® (0,3% m/m) com a MC (1,5% m/m) e Wu *et al.* (2011) [232] misturaram o Carbopol® 974P (0,3% m/m) com a HPMC E4M (0,6% m/m) e com a baicalina, tendo verificado a gelificação das formulações ao entrarem em contacto com o pH e com a temperatura dos tecidos oculares. Em todos estes estudos, foi verificado um aumento do tempo de residência das formulações na zona pré-corneal e uma libertação prolongada dos fármacos, promovendo desta forma um aumento da eficácia terapêutica.

Os policarbofilos (PCP) são também polímeros bioadesivos aniônicos sensíveis ao pH que podem ser utilizados na administração ocular de fármacos, sendo constituídos na sua rede polimérica pelo PAA, éter de polialquilenos e divinil glicol [31,63,233-236]. Lehr *et al.* (1994) [237] utilizaram com sucesso o policarbofilo (PCP) para a administração tópica de gentamicina, conseguindo aumentar o tempo de residência pré-corneal devido à gelificação da formulação na superfície ocular, duplicando a absorção do fármaco quando comparada com a solução aquosa de gentamicina. Por outro lado, tanto o Carbopol® (Carbopol® 1342) como o policarbofilo (PCP) foram utilizados em diferentes estudos para dispersar lipossomas, aumentando a retenção dos lipossomas nos tecidos oculares, promovendo um aumento da biodisponibilidade do fármaco veiculado [238,239]. Por outro lado, Shen *et al.* (2014) [236] prepararam um emulgel de PCP veiculando a ciclosporina A, obtendo uma formulação que promoveu o aumento do tempo de residência ocular, aumentando por consequência a biodisponibilidade ocular deste fármaco, além de não provocar qualquer tipo de irritação ocular.

O acetatoftalato de celulose (CAP) é um polímero sensível ao pH, biocompatível, não irritante para os tecidos oculares, que se apresenta no estado líquido não viscoso a valores de pH de 4,4, sofrendo gelificação quando o pH atinge um valor de 7,4 [11,31,40,63,240,241]. A gelificação ocorre devido à neutralização dos grupos ácidos existentes nas cadeias poliméricas do CAP. Gurny (1981) [240] preparou nanopartículas de CAP veiculando a pilocarpina, sendo que a formulação final apresentava um valor de pH de 4,5, mas quando em contacto com o pH da superfície ocular, verificou-se um aumento da viscosidade da formulação, evitando desta forma, a eliminação rápida do fármaco, aumentando exponencialmente o efeito terapêutico da pilocarpina.

#### 1.2.4.1.2.7.2.1 Quitosano

O quitosano é um aminopolissacarídeo catiónico, obtido por desacetilação alcalina da quitina, um polissacarídeo natural presente no camarão e na casca de caranguejo [11,21,24,29,51,62,67,83,92,218,242-249]. Este polímero apresenta várias vantagens, nomeadamente, o facto de ser biocompatível, biodegradável e sensível ao pH (solúvel na água até um pH de 6, e na maioria dos ácidos orgânicos, como por exemplo, ácido fórmico, acético, tartárico e cítrico, gelificando com o aumento do pH) [11,21,24,29,51,62,67,83,92,218,242-249]. Além das vantagens descritas anteriormente destaca-se o facto de possuir propriedades mucoadesivas e antimicrobianas, potenciando também a permeabilidade membranar e transcorneal (ou potenciando a abertura das estreitas junções existentes entre as células epiteliais ou através de mecanismos intracelulares ou ainda baseado nas interações entre as cargas positivas do quitosano e as cargas da membrana celular, obrigando a uma reorganização estrutural da membrana celular) [11,21,24,29,51,62,67,83,92,218,242-249].

A solubilidade do quitosano na presença de valores de pH inferiores a 6 deve-se ao facto dos grupos amina do quitosano se encontrarem protonados, sendo que o quitosano apresenta um comportamento policatiónico, enquanto na presença de valores de pH superiores a 6,5 estes grupos amina do quitosano encontram-se desprotonados, podendo estabelecer interações com substâncias existentes no meio circundante [21,248].

O quitosano apresenta propriedades mucoadesivas, uma vez que estabelece pontes de hidrogénio e interações eletrostáticas entre os grupos amina com carga positiva do quitosano e as cargas negativas dos resíduos de ácido siálico da mucina [11,21,29,242-244,249]. Estas interações entre o quitosano e a mucina são dependentes

do pH circundante, sendo altamente favoráveis a pH neutro ou ligeiramente alcalino e desfavoráveis a pH ácido uma vez que os grupos amina do quitosano estão protonados [11].

A Tabela III mostra alguns exemplos da utilização do quitosano em formulações oftálmicas tópicas.

**Tabela III.** Exemplos da utilização do quitosano em formulações oftálmicas tópicas.

Formulação Oftálmica	Resultados	Referência
Preparação de um hidrogel oftálmico de quitosano (0,5-1,5%, m/m) contendo tobramicina (0,3%, m/m).	- O hidrogel de quitosano aumentou em três vezes o tempo de residência pré-corneal da tobramicina quando comparada com a solução de tobramicina existente no mercado.	[250]
Desenvolvimento de um hidrogel de quitosano (1,071%, m/m), $\beta$ -glicerol fosfato (0,952% m/m) e hidroxietilcelulose (HEC) (0,476-1,429% m/m) veiculando a pilocarpina.	- O aumento da concentração de HEC no hidrogel promoveu o aumento da viscosidade da formulação. - Todas as formulações promoveram uma liberação prolongada do fármaco veiculado durante 10 horas, sendo que quanto menor for a concentração de HEC na formulação, maior é a taxa de liberação do fármaco quando comparada com as restantes formulações.	[251]
Preparação de um hidrogel de quitosano e HPMC veiculando o maleato de timolol.	- A retenção ocular foi avaliada por cintigrafia gama, concluindo-se que a formulação permanece muito tempo na superfície ocular sendo a sua taxa de eliminação lenta, não provocando a irritação dos tecidos oculares. - Estudos <i>in vitro</i> demonstraram uma liberação prolongada do fármaco por mais de 24 horas.	[252]

#### 1.2.4.1.2.7.3 Formulações oftálmicas preparadas com dois ou mais polímeros sensíveis a estímulos

A preparação de formulações oftálmicas de administração tópica com base na combinação de polímeros que respondem a estímulos diferentes (polímeros sensíveis à temperatura, polímeros sensíveis ao pH ou polímeros sensíveis à força iônica) aproveitando as diferentes características físico-químicas específicas e intrínsecas dos tecidos oculares é uma estratégia que promove o aumento da biodisponibilidade do fármaco e a eficácia terapêutica [15,19]. Pode-se assim afirmar que uma formulação oftálmica ideal deve incluir diferentes polímeros que sofram transição de fase sol-gel na presença de diferentes estímulos como sejam, a temperatura da superfície ocular, o pH e a presença de certos eletrólitos no fluido lacrimal, além de terem de apresentar

preferencialmente um comportamento reológico pseudoplástico [19]. Neste tipo de formulações, tira-se partido de uma rápida e imediata transição sol-gel na presença das características únicas dos tecidos oculares.

Ultimamente, com o intuito de aumentar a biodisponibilidade das formulações oculares, não só se combinou na mesma formulação polímeros que respondem a estímulos diferentes como também se adicionaram alguns destes polímeros a dispersões coloidais (nanopartículas, lipossomas, micelas, nanosuspensões, etc.), promovendo um aumento ainda maior da eficácia terapêutica dos fármacos veiculados [11,23,37,39,45,46,77,81].

A Tabela IV mostra alguns exemplos de formulações oftálmicas preparadas utilizando dois ou mais polímeros sensíveis a estímulos.

**Tabela IV.** Exemplos da utilização de formulações oftálmicas preparadas utilizando dois ou mais polímeros sensíveis a estímulos.

Formulação Oftálmica	Resultados	Referência
Desenvolvimento de um hidrogel oftálmico baseado na combinação do PF 127 e do Carbopol® 934P veiculando o cloridrato de pilocarpina.	- O estudo demonstrou que a associação no mesmo hidrogel do PF 127 e do Carbopol® 934P promoveu um aumento do tempo de residência pré-corneal e o aumento da libertação prolongada do cloridrato de pilocarpina quando comparados com o hidrogel de PF 127 ou com o hidrogel de Carbopol® 934P utilizados individualmente.	[195]
Comparação do desempenho de um hidrogel de PF 127 com um hidrogel baseado na associação do PF 127 e do alginato de sódio veiculando a pilocarpina.	- A combinação do polímero PF 127 com o alginato de sódio no mesmo hidrogel promoveu um aumento da libertação prolongada da pilocarpina quando comparado com os hidrogéis preparados com cada um dos polímeros. - Os ensaios <i>in vivo</i> demonstraram que a formulação otimizada aumentou o tempo de residência na zona pré-corneal e dessa forma a biodisponibilidade do fármaco.	[148]
Otimização de um hidrogel oftálmico preparado com PF 127 e quitosano contendo maleato de timolol.	- O hidrogel que demonstrou melhores características reológicas e capacidade de gelificação apresentou uma concentração de 9% de PF 127 e 0,25% de quitosano. - A formulação encontrava-se no estado líquido à temperatura ambiente e a valores de pH entre 6 e 6,2, apresentava uma rápida transição de fase sol-gel a uma temperatura de 37°C e a um pH fisiológico de 7,4.	[253]
Desenvolvimento de um hidrogel termossensível composto por uma mistura de PF 127, Carbopol® 934P	- A adição de HPMC K4M ou Carbopol® 934P provocou a diminuição da temperatura de gelificação do hidrogel de PF 127, enquanto a viscosidade	[152]



ou HPMC K4M veiculando o penciclovir.	<p>aumentou.</p> <p>- Da mesma forma, a adição de HPMC K4M ou Carbopol® 934P promoveu uma libertação mais prolongada do penciclovir quando comparado com o hidrogel de PF 127.</p> <p>- Os estudos <i>in vivo</i> demonstraram que os hidrogéis preparados com a adição de HPMC K4M ou Carbopol® 934P a 12% (m/m) de PF 127 são uma excelente alternativa, aumentado exponencialmente a biodisponibilidade ocular do penciclovir.</p>	
Preparação de um hidrogel ocular composto por Carbopol® 940 (0,4% m/m) e quitosano (0,5% m/m) contendo maleato de timolol.	<p>- O hidrogel encontrava-se no estado líquido à temperatura ambiente e a um valor de pH de 6,0 apresentando uma rápida transição de fase sol-gel a pH 7,4.</p> <p>- Este hidrogel promoveu o aumento do tempo de residência da formulação no saco conjuntival, provocando um aumento da eficácia terapêutica quando comparada com a solução de maleato de timolol disponível no mercado.</p>	[254]
Preparação de um hidrogel oftálmico baseado numa mistura de PF 127 (15-25%, m/m), quitosano de baixo peso molecular (0,05-0,3%, m/m) e sulfato de condroitina (0,05-0,3%, m/m) contendo maleato de timolol.	<p>- A formulação preparada com PF 127 15%, 0,05% de quitosano e 0,05% de sulfato de condroitina demonstrou ser uma alternativa viável para a administração tópica de maleato de timolol.</p> <p>- A referida formulação encontrava-se no estado líquido em condições não fisiológicas e sofria uma transição sol-gel quando submetida às condições fisiológicas, ou seja, 37°C e pH 7,4.</p>	[255]
Preparação de um hidrogel ocular baseado na mistura do PF 127 e o Carbopol® 974 veiculando o atenolol.	<p>- A adição de Carbopol® 974 promoveu a diminuição da quantidade necessária de PF 127 e promoveu o aumento da libertação prolongada do atenolol, atingindo mais de 8 horas.</p> <p>- Os ensaios <i>in vivo</i> demonstraram que o hidrogel baseado no PF 127 e Carbopol® 974 promoveu um aumento da biodisponibilidade e da eficácia terapêutica do atenolol quando comparado com a solução aquosa de atenolol disponível no mercado.</p>	[256]
Otimização de um hidrogel ocular baseado numa mistura de PF 127 (14-20%, m/m) e quitosano (0,1-0,3%, m/m) veiculando o extrato de planta <i>Sesbania grandiflora</i> .	<p>- Os estudos demonstraram que a libertação do fármaco está dependente das concentrações de PF 127 e quitosano no hidrogel.</p> <p>- A formulação otimizada (PF 127 17%, m/m e quitosano 0,3%, m/m) demonstrou não só uma libertação prolongada do fármaco veiculado como também promoveu um aumento do tempo de residência pré-corneal e da eficácia antimicrobiana.</p>	[176]
Preparação de um hidrogel de alginato de sódio (0,2%, m/m) e quitosano (0,5%, m/m) contendo levofloxacina (0,5%).	<p>- Os resultados demonstraram que a formulação não desenvolveu qualquer tipo de toxicidade nos tecidos oculares, promovendo uma libertação prolongada da levofloxacina e uma elevada retenção ocular, potenciando a eficácia terapêutica quando comparada com a formulação existente no mercado.</p>	[257]

#### 1.2.4.1.3 Transportadores coloidais – considerações gerais

Dentre os transportadores coloidais mais utilizados em sistemas terapêuticos destacam-se os lipossomas, as nanoemulsões e as nanopartículas (poliméricas e lipídicas). Cada um destes transportadores coloidais apresenta vantagens e desvantagens:

- os lipossomas apresentam várias desvantagens, nomeadamente o facto de promoverem uma libertação rápida do fármaco, serem instáveis sob condições físico-químicas extremas (ex. estômago), serem sensíveis a alguns métodos de esterilização, além de apresentarem limitações na transposição de escala [258-260];
- as nanoemulsões apresentam como principal desvantagem o facto de proporcionarem uma libertação rápida do fármaco, além do facto de necessitarem de elevadas concentrações de agentes tensioativos para a sua produção [259,260];
- as nanopartículas poliméricas apresentam como principal desvantagem o facto de necessitarem de solventes orgânicos para a sua obtenção [259,261].

O uso de sistemas transportadores coloidais, especialmente as nanopartículas poliméricas e lipídicas, na administração tópica de fármacos apresenta muitas vantagens, destacando-se o facto de serem:

- biocompatíveis, biodegradáveis, não tóxicos e não irritantes para os tecidos;
- apresentarem elevada capacidade e eficácia de encapsulação;
- protegerem o fármaco veiculado da degradação, conferindo-lhe também estabilidade;
- vetorizarem o fármaco para um alvo terapêutico específico;
- promoverem uma libertação prolongada do fármaco veiculado;
- aumentarem a capacidade de penetração do fármaco veiculado através dos tecidos devido ao tamanho reduzido destes sistemas;
- apresentarem propriedades mucoadesivas, aumentando assim a biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis em água;
- reduzirem os efeitos secundários;
- reduzirem o número de administrações diárias [11,13,20,23,25,26,33,34,37,39,40,45,46,58,59,67,81,129,173,247,260,262-274].

As nanopartículas têm a capacidade de vetorizar o fármaco para um alvo específico revolucionando desta forma o tratamento de muitas patologias oftálmicas,

aumentando o tempo de retenção do fármaco na zona pré-corneal, promovendo exponencialmente o aumento da absorção ou penetração da formulação através dos tecidos oculares, aumentando a eficácia terapêutica e a biodisponibilidade do fármaco ocular no alvo terapêutico [39,45,58,59,81,262,270-273].

Para a obtenção de nanopartículas com excelentes características físico-químicas, pode-se recorrer a diferentes técnicas, nomeadamente, a polimerização de monómeros, a precipitação/coacervação, a coacervação modificada, a gelificação ionotrópica, a tecnologia de fluidos supercríticos, a inversão de fases, a extrusão por membrana, a microemulsificação, a emulsificação espontânea/difusão de solvente, a emulsificação - evaporação do solvente, a nanoprecipitação, a difusão de solvente quase-emulsão, os ultrassons e a homogeneização a alta pressão (HPH) [58,81,275,276,277].

De uma forma genérica, as nanopartículas podem ser de dois tipos: as nanoesferas (o fármaco encontra-se homogeneamente disperso na matriz polimérica ou adsorvido à superfície das nanopartículas) ou as nanocápsulas (o fármaco encontra-se disperso ou dissolvido na cavidade central das nanopartículas encontrando-se envolvido por uma membrana polimérica) [14,32,26,270,272].

Os sistemas coloidais para serem bem tolerados pelos tecidos oculares devem apresentar um tamanho máximo de 400 nm [13,32,39,45,46,59,81,267,272,278,279]. Os sistemas terapêuticos de tamanho nanométrico são capazes de penetrar através dos tecidos oculares, podendo atingir os alvos terapêuticos intraoculares, funcionando as nanopartículas como reservatórios de fármaco, libertando-o ao longo do tempo de forma a potenciar a sua ação terapêutica [13,32,39,45,46,59,81,267,272,278,279].

Além do tamanho, a forma e a carga elétrica das nanopartículas desempenham um papel fundamental na interação com os tecidos oculares, condicionado a mucoadesividade e o tempo de residência ocular da formulação [14,46,58,272,278]. O método de preparação e as suas variáveis (dependendo do método escolhido pode-se fazer variar diferentes propriedades: temperatura, pressão, amplitudes, número de ciclos, tempos dos ciclos, etc.), os lípidos ou polímeros escolhidos e o(s) tensioativos(s) utilizados são factores que podem fazer variar as propriedades físico-químicas das nanopartículas (tamanho, forma e carga elétrica), condicionando o tempo de residência na zona pré-corneal, a adesão e a penetração através dos tecidos oculares, influenciando também a libertação do fármaco a partir das nanopartículas [14,54,280].

Desta forma, as nanopartículas poliméricas e lipídicas com carga positiva (preparadas recorrendo a polímeros ou lípidos catiónicos ou revestidas por estes) têm a capacidade de interagir com as cargas negativas dos tecidos oculares (essencialmente glicoproteínas como a mucina), aumentando o tempo de residência ocular e reduzindo a

probabilidade de eliminação prematura pelos mecanismos normais do globo ocular [14,46,52,58,59,270,272,278,281]. Além do tamanho, a forma, especialmente a forma irregular, pode fazer aumentar a área de contacto das nanopartículas com a superfície ocular através de interações de van der Waals [26,27,269,282,283].

Para a correta administração tópica deste tipo de sistema coloidal, as nanopartículas têm que se encontrar dispersas num meio apropriado de forma a serem facilmente administradas sob a forma de colírio [11,12,19,81].

Pode-se recorrer às vantagens da nanotecnologia para o tratamento das diferentes patologias oculares que atingem diferentes zonas ou tecidos oculares, nomeadamente, no segmento anterior: cristalino (cataratas relacionadas com a idade), córnea e esclera (conjuntivite alérgica, queratite), coróide, corpo ciliar e íris (uveíte, iridite, coróidite, neoangiogénese da coróide); ou no segmento posterior: humor vítreo (endoftalmite bacteriana e fúngica), retina (edema retiniano, retinite pigmentosa, maculopatia e degeneração macular relacionada com a idade, retinite viral, vitreoretinopatia proliferativa, retinopatia diabética, oclusão da veia central da retina; tumores intraoculares), nervo ótico (glaucoma); ou ainda em outro tipo de patologias oculares (inflamações, infeções bacterianas, alergias e doenças imunes) [13].

#### 1.2.4.1.3.1.Nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas têm sido alvo de muito estudo no que se refere à sua utilização na administração oftálmica de fármacos. A utilização deste tipo de nanopartículas nas terapias oftálmicas apresenta muitas vantagens, nomeadamente:

- são preparadas com polímeros biodegradáveis, biocompatíveis e não irritantes para a mucosa ocular;
- apresentam propriedades mucoadesivas;
- protegem o fármaco veiculado principalmente da degradação enzimática;
- conferem estabilidade e solubilidade a fármacos pouco solúveis;
- são também fáceis de preparar e a custos reduzidos [59,81,243,249,270,284-293].

A utilização de polímeros mucoadesivos (quitosano, ácido hialurónico, alginato de sódio, poloxâmeros, polietilenoglicol, colagénio, albumina, policaprolactona, poliacrilato, ácido polilático, polialquicianoacrilatos, etc.) na preparação de sistemas coloidais de aplicação tópica ocular, conjuga no mesmo sistema farmacêutico, não só as vantagens associadas às dimensões deste tipo de sistema terapêutico, com também o facto deste

tipo de polímeros ter a capacidade de estabelecer interações com as glicoproteínas existentes na superfície ocular [18,26,27,55,59,81,115,243,249,267,278,287-296]. Estas características fazem das nanopartículas sistemas terapêuticos que conseguem promover um aumento do tempo de resistência pré-corneal da formulação, aumentando a sua capacidade de penetração nos tecidos oculares, diminuindo a probabilidade de o fármaco ocular ser eliminado de forma prematura, aumentando consideravelmente a eficácia terapêutica [26,27,59,81,243,278,287,290,292,296,297].

As nanopartículas poliméricas podem ser preparadas recorrendo a diferentes técnicas, destacando-se, a polimerização de monómeros, emulsificação - evaporação do solvente, emulsificação-difusão de solvente, a nanoprecipitação, a coacervação, a gelificação ionotrópica, a tecnologia dos fluidos supercríticos e a homogeneização a alta pressão (HPH) [81,275].

A Tabela V mostra alguns exemplos da utilização de nanopartículas poliméricas em formulações oftálmicas tópicas.

**Tabela V.** Exemplos da utilização de nanopartículas poliméricas em formulações oftálmicas tópicas.

Formulação Oftálmica	Resultados	Referência
Desenvolvimento de nanocápsulas de policaprolactona revestidas com um dos polímeros mucoadesivos catiónicos, quitosano ou poli-L(lisina), veiculando a indometacina.	- Apesar de ambos os polímeros serem mucoadesivos e catiónicos, somente as nanocápsulas revestidas com quitosano promoveram o aumento da penetração intraocular de indometacina relativamente às nanocápsulas de indometacina não revestidas.	[298]
Desenvolvimento de nanopartículas de quitosano veiculando a ciclosporina A.	- Estudos <i>in vitro</i> demonstraram que na primeira hora existe uma rápida libertação do fármaco veiculado, sendo que depois se verifica uma libertação prolongada durante mais de 24 horas. - Estudos <i>in vivo</i> demonstraram que é possível detetar o fármaco nos tecidos pré-corneais passadas 48 horas após a administração.	[299]
Preparação de nanoesferas de ácido polilático (PLA) contendo aciclovir, revestidas ou não pelo PEG.	- Ambas as formulações promoveram a libertação prolongada do aciclovir. - As nanoesferas revestidas com PEG demonstraram uma maior eficácia terapêutica do que as nanopartículas não revestidas com PEG.	[300]
Desenvolvimento de nanopartículas de ácido polilático (PLA) e quitosano (CS) veiculando a rapamicina.	- A formulação promoveu o aumento do tempo de retenção pré-corneal e uma libertação prolongada da rapamicina nos tecidos oculares.	[245]
Preparação de nanopartículas de quitosano e alginato de sódio veiculando a gatifloxacina.	- A junção destes dois polímeros sensíveis a estímulos promoveu um aumento exponencial das propriedades mucoadesivas e da libertação prolongada (durante mais de 24 horas) da	[25]

	gatifloxacina.	
Desenvolvimento de nanopartículas de Eudragit® RS 100 e Eudragit® RL 100 revestidas por ácido hialurônico veiculando a gatifloxacina e a prednisolona.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- As nanopartículas preparadas com estes polímeros promoveram o aumento do tempo de residência pré-corneal, aumentando por conseguinte a penetração intracelular da formulação.</li> <li>- Este sistema coloidal promoveu uma libertação prolongada dos fármacos veiculados (durante mais de 6 horas).</li> </ul>	[301]
Preparação de nanopartículas utilizando o quitosano e a sulfobutiléter-β-ciclodextrina veiculando o nitrato de econazol.	Por comparação com a solução aquosa do fármaco, ensaios <i>in vivo</i> demonstraram que as nanopartículas preparadas neste estudo promoveram uma libertação modificada de nitrato de econazol, promovendo um efeito terapêutico mais eficaz.	[293]
Preparação de nanopartículas poliméricas de alginato de sódio e quitosano revestidas com quitosano veiculando o 5-fluorouracilo.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- O revestimento com quitosano promoveu o aumento da mucoadesividade das nanopartículas quando comparado com as nanopartículas não revestidas com quitosano.</li> <li>- Estudos <i>in vivo</i> realizados em coelhos demonstraram que se verificou um aumento da eficácia terapêutica.</li> </ul>	[295]
Preparação de nanopartículas poliméricas com quitosano e lecitina veiculando a natamicina.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Estudos <i>in vitro</i> demonstraram que se verificou uma libertação prolongada da natamicina.</li> <li>- Estudos <i>in vivo</i> realizados em coelhos demonstraram que se registou um aumento do tempo de residência pré-corneal devido às propriedades mucoadesivas dos polímeros utilizados na preparação das nanopartículas.</li> </ul>	[302]
Preparação de nanopartículas poliméricas de quitosano com daptomicina.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- As nanopartículas preparadas apresentaram um tamanho aproximado de 200 nm, um baixo PI (índice de polidispersão), um potencial zeta positivo e uma eficácia de encapsulação superior a 80%.</li> <li>- A incubação das nanopartículas com lisozima não afetou a integridade e as propriedades físico-químicas, enquanto a incubação com a mucina promoveu alterações significativas do potencial zeta, indicando a existência de interações eletrostáticas entre ambos.</li> </ul>	[297]
Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas de PLGA encapsulando a sparfloxacina dispersas num hidrogel de quitosano.	- A dispersão das nanopartículas poliméricas num hidrogel de quitosano que gelifica somente quando entra em contacto com o pH dos tecidos oculares, aumenta o tempo de residência da formulação na superfície ocular, diminuindo a eliminação prematura da formulação ocular, potenciando a absorção intraocular das nanopartículas poliméricas.	[303]
Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas de PLGA encapsulando a levofloxacina, dispersas num hidrogel de quitosano.	- Registou-se um aumento do tempo de residência da formulação na zona pré-corneal, aumentando a biodisponibilidade terapêutica.	[304]
Preparação de nanopartículas	- Os resultados demonstraram que as nanopartículas	[249]

poliméricas de quitosano (0,2-0,4%, m/m) encapsulando a ofloxacina.	preparadas apresentaram um tamanho e um potencial zeta positivo adequado à administração ocular, apresentando também uma libertação prolongada do fármaco de mais de 6 horas. - Os estudos <i>in vivo</i> realizados em coelhos revelaram que a dispersão coloidal preparada promoveu um aumento do tempo de retenção da formulação nos tecidos oculares, verificando-se um aumento da eficácia terapêutica da formulação quando comparada com a formulação existente no mercado.
---	--

#### 1.2.4.1.3.2 Nanopartículas lipídicas

As nanopartículas lipídicas quando comparadas com os restantes transportadores coloidais apresentam variadíssimas vantagens, entre as quais se destacam as seguintes:

- são preparadas recorrendo a técnicas económicas;
- são preparadas sem recurso à utilização de solventes orgânicos, recorrendo sim à utilização de lípidos designados por GRAS (reconhecidos como seguros e não tóxicos, biocompatíveis e biodegradáveis pela FDA);
- apresentam elevada capacidade de encapsulação de fármacos lipófilos;
- apresentam propriedades mucoadesivas, devido não só ao tamanho, carga superficial e forma das nanopartículas, como também devido ao seu carácter lipídico capaz de interagir com a camada lipídica do filme lacrimal;
- conferem estabilidade e proteção ao fármaco veiculado;
- promovem o aumento do tempo de residência na zona pré-corneal;
- proporcionam uma libertação prolongada dos fármacos;
- permitem a vetorização do fármaco para um alvo terapêutico específico, aumentado com isto, a biodisponibilidade da forma farmacêutica [11,45,46,54,58,59,81,260,262,268,269,270,272,277,278,283,291,305-318]. Entre os lípidos mais utilizados para a preparação de nanopartículas lipídicas destacam-se os fosfolípidos, as ceramidas e os glicerídeos [59].

As nanopartículas lipídicas podem ser de dois tipos, as nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) e os vetores lipídicos nanoestruturados (NLC). As SLN são nanopartículas produzidas utilizando lípidos sólidos, agentes tensioativos e água. Este tipo de nanopartículas apresenta uma estrutura cristalina perfeita, traduzindo-se esta característica, regra geral, numa menor capacidade de encapsulação do fármaco [259,319]. A expulsão do fármaco durante o período de armazenamento (os lípidos sofrem transições polimórficas de configurações instáveis para configurações mais

estáveis) e a contaminação por microrganismos devido à elevada quantidade de água na sua constituição são duas importantes desvantagens associadas a este tipo de nanopartículas [259,262,319,320].

As NLC são nanopartículas lipídicas de segunda geração, tendo sido criadas para resolver algumas das limitações das SLN. As NLC apresentam uma eficácia de encapsulação do fármaco superior, uma vez que, ao contrário das SLN, as NLC são preparadas não só por lípidos sólidos como também por lípidos líquidos. A inclusão de um lípido líquido na estrutura das nanopartículas lipídicas, numa proporção nunca inferior a 30% relativamente aos lípidos sólidos, origina a criação de redes cristalinas imperfeitas com espaços internos para poder acomodar mais moléculas de fármaco, conferindo um aumento da eficácia de encapsulação das NLC, prevenindo também a expulsão do fármaco durante o tempo de armazenamento [262,269,310,314]. A solubilização do fármaco veiculado pelos lípidos é fundamental para a obter nanopartículas lipídicas com uma elevada eficácia de encapsulação [274,276,316,319,321].

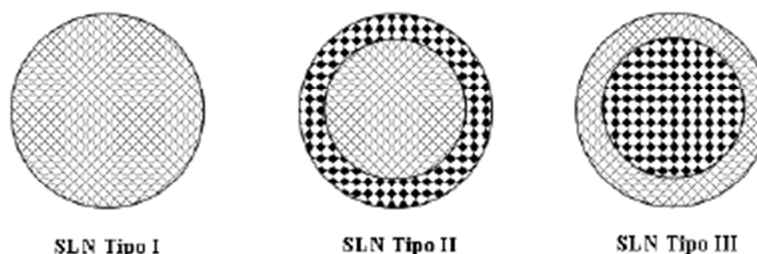
Outra característica importante é a seleção do(s) tensioativos(s). O(s) tensioativos(s) desempenham um papel fundamental na estabilidade físico-química e termodinâmica das nanopartículas, formando um filme ou camada em torno da matriz lipídica sólida [14,270]. Os tensioativos mais utilizados na preparação das nanopartículas podem ser divididos em três grandes grupos: lípidos (lecitina e fosfolípidos), sais biliares (taurocolato de sódio) e moléculas não iónicas (copolímeros de oxietieno/polioxietileno, ésteres do sorbitano, ácidos gordos etoxilados) [14,270]. Salienta-se o facto de existirem formulações farmacêuticas baseadas em nanopartículas com relatos de toxicidade relacionada com a escolha do(s) tensioativo(s) [263,266,270]. Assim, para evitar qualquer tipo de toxicidade relacionada com o uso das nanopartículas, devem ser escolhidos preferencialmente tensioativos não iónicos [263,266,270]. De referir que as nanopartículas lipídicas requerem uma menor concentração de tensioativo, não necessitando de co-tensioativos, o que se traduz em vantagens claras deste tipo de transportadores coloidais quando comparadas com as restantes [270]. A utilização de uma menor quantidade de agente tensioativo na preparação de nanopartículas lipídicas pode promover um aumento do tamanho das nanopartículas ao longo do tempo de armazenamento [259]. Além disso, para a escolha do tensioativo deve-se ter em atenção o valor do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) e os efeitos que este pode ter nos lípidos escolhidos e nas propriedades físico-químicas das nanopartículas, como sejam, o tamanho, o PI e o ZP [263,266,270].



#### 1.2.4.1.3.2.1 Modelos de incorporação de fármacos em SLN

A literatura científica identifica três tipos de SLN, nomeadamente as SLN tipo I, SLN tipo II e SLN tipo III, dependendo a sua classificação da localização e distribuição do fármaco na matriz lipídica [262,270,314,318,322].

A natureza química do fármaco e da matriz lipídica, a solubilidade do fármaco na matriz lipídica fundida, o tipo e a concentração do tensioativo usado, o método e a temperatura de produção são as principais características que fazem com que se obtenham diferentes SLN [270,323,324].



**Figura 5.** Modelos teóricos representativos dos diferentes tipos de SLN ilustrando a localização do fármaco na matriz lipídica sólida. (a) SLN tipo I; (b) SLN tipo II; (c) SLN tipo III (adaptado com permissão de Souto *et al.* 2007 [325]).

As SLN tipo I são denominadas de modelo da matriz homogênea, sendo que este tipo de SLN é caracterizado pela distribuição homogênea e uniforme do fármaco pela matriz lipídica sólida, promovendo a obtenção de formas farmacêuticas de libertação controlada [318,322,325,326]. Este tipo de nanopartículas é obtido através do método de HPH a quente ou a frio [325].

As SLN tipo II são denominadas de modelo da parede enriquecida de fármaco [322]. Este tipo de SLN é caracterizado pela presença de uma elevada quantidade de fármaco na parede da matriz lipídica, contrariando o que se verifica no seu núcleo lipídico, onde se verifica uma baixíssima concentração de fármaco [318,322,325,326]. Aquando da sua preparação e devido à elevada solubilidade do fármaco na fase aquosa a elevadas temperaturas, verifica-se que, durante a HPH, o fármaco dissipa-se da fase lipídica para a fase aquosa. Com o arrefecimento da nanoemulsão, formam-se núcleos lipídicos sem fármaco, verificando-se ao mesmo tempo a diminuição da solubilidade do fármaco na fase aquosa, sendo que este tenta dissipar-se para a fase lipídica, enriquecendo a parede das nanopartículas recém formadas [259,262,322,329]. Neste tipo

de SLN não existe uma libertação controlada de fármaco, mas sim uma libertação rápida do fármaco veiculado [259,322,325].

Por fim, as SLN tipo III, também denominadas modelo de núcleo enriquecido em fármaco, apresentam as moléculas de fármaco no interior da SLN, estando ausente nas camadas externas das SLN [318,322,325,326]. O fármaco presente em concentrações de saturação ou perto destas na matriz lipídica fundida, precipita antes de acontecer a recristalização lipídica, o que leva a que a matriz lipídica envolva as moléculas de fármaco, proporcionando desta forma, a sua libertação controlada [318,322,325,326].

#### 1.2.4.1.3.2.2 Modelos de incorporação de fármacos em NLC

A literatura científica identifica três tipos de NLC, nomeadamente as NLC tipo I, NLC tipo II e NLC tipo III, dependendo a sua classificação do método de preparação, da composição da matriz lipídica e do tipo de lípidos que constituem a matriz lipídica [259,262,270,314,325].



**Figura 6.** Modelos teóricos representativos dos três tipos NLC. (a) NLC tipo I; (b) NLC tipo II; (c) NLC tipo III (adaptado com permissão de Souto *et. al.*, 2007 [325]).

As NLC tipo I são definidas como modelo do cristal imperfeito. Este tipo de NLC é obtido quando a matriz lipídica se forma a partir de uma mistura de lípidos sólidos e líquidos estruturalmente muito diferentes entre si, prevenindo desta forma a formação de um cristal perfeito, ou de uma estrutura ordenada, levando à formação de uma matriz lipídica com muitas imperfeições, permitindo a existência de espaços internos que podem ser usados para a acumulação de elevadas quantidades de fármaco [259,314,326]. Este tipo de NLC também é obtido quando a proporção entre lípidos sólidos e líquidos é muito desigual [259,314,325,326].

As NLC tipo II são definidas como modelo amorfo, sendo que este tipo de NLC é caracterizado pela mistura de lípidos sólidos com lípidos líquidos especiais (ex. Miglyol®

812), sendo que estes lípidos não recristalizam totalmente durante o processo de produção ou durante o arrefecimento [259,314,325,326,327]. A vantagem deste tipo de NLC é a criação de estruturas amorfas, em vez de estruturas cristalinas, prevenindo a expulsão do fármaco após a produção ou durante o armazenamento [259,314,325,327].

As NLC tipo III são definidas como modelo múltiplo, sendo que neste tipo de NLC os compartimentos de lípido líquido encontram-se completamente separados e aprisionados dentro da matriz lipídica sólida, formando como que nanocompartimentos de lípido líquido no interior do núcleo de lípido sólido [259,314,326]. Este fenómeno acontece quando é ultrapassada a miscibilidade ou solubilidade entre o lípido líquido e o lípido sólido à temperatura ambiente, devido à elevada quantidade de lípido líquido usada na preparação das NLC [259,314,326]. Este tipo de modelo é muito importante e é aplicável quando o fármaco apresenta uma maior solubilidade no lípido líquido do que no lípido sólido [314,326].

#### 1.2.4.1.3.2.3 Métodos de preparação das nanopartículas lipídicas

Para produzir nanopartículas lipídicas pode-se recorrer a diferentes técnicas, entre as quais destacam-se, a homogeneização a alta pressão (HPH), a fusão-emulsificação seguida de ultrasonicação, a microemulsão, a emulsificação-evaporação do solvente, a emulsificação-difusão do solvente, a substituição do solvente, a inversão de fases, fluídos supercríticos e a extrusão em membrana [259,314,326]. A seleção do método de preparação das nanopartículas lipídicas depende das propriedades físico-químicas do fármaco, além do tipo e da quantidade de nanopartículas lipídicas a produzir [314].

A homogeneização a alta pressão (HPH) é a técnica mais utilizada na preparação de nanopartículas lipídicas, uma vez que se trata de uma técnica simples e rentável, permitindo uma fácil transposição de escala, sendo no entanto necessário equipamento específico com um custo relativamente elevado [259,314,325]. Esta técnica baseia-se, primeiramente, na fusão da matriz lipídica e consequente adição do fármaco na matriz lipídica fundida. Após este passo ocorre a emulsificação da matriz lipídica fundida com a fase aquosa que contém o agente tensioativo, com recurso a um homogeneizador de alta pressão [259,269,314,326]. Na HPH a amostra é forçada a passar por um pequeníssimo orifício com dimensões que variam entre os 10 e os 30  $\mu\text{m}$  sob uma elevadíssima pressão criando tensões de corte e forças de cavitação responsáveis pela produção das nanopartículas [259].

A HPH pode ser a quente ou a frio. Na HPH a quente ocorre inicialmente a fusão da matriz lipídica a uma temperatura 5 a 10°C acima da temperatura de fusão dos lípidos selecionados, sendo-lhe adicionada a fase aquosa contendo o agente tensioativo aquecida a uma mesma temperatura, formando-se uma pré-emulsão quente com recurso a agitação mecânica (ex. Ultra-Turrax), sendo esta posteriormente sujeita a HPH obtendo-se uma nanoemulsão, que depois é arrefecida à temperatura ambiente [259,314,326,328]. Na HPH a frio o fármaco é inicialmente disperso no lípido fundido, sendo depois arrefecido com recurso a gelo ou azoto líquido [259,314,326,328]. Após a solidificação da matriz lipídica esta é fragmentada em micropartículas (50-100 µm) com auxílio de um moinho, sendo estas adicionadas sob agitação a uma fase aquosa arrefecida contendo o agente tensioativo, e a pré-emulsão é finalmente sujeita a HPH à temperatura ambiente) [259,314,326,328]. Como facilmente se percebe, a alteração dos diferentes parâmetros da HPH como a temperatura, a pressão e o número de ciclos, influenciam o tamanho e a forma das nanopartículas [314]. A HPH a quente apresenta como desvantagem o facto de se realizar a elevadas temperaturas podendo levar à degradação do fármaco, o que não acontece na HPH a frio [259,329]. De salientar também que, no caso de fármacos lipófilos, a HPH a quente promove uma maior encapsulação de fármaco, sendo que para fármacos hidrófilos, deve-se utilizar a HPH a frio, pela razão de que durante a HPH a quente, o fármaco não se incorpora na matriz lipídica [259,318].

Na técnica de fusão-emulsificação com ultrasonicação a matriz lipídica é aquecida, a uma temperatura de 5 a 10°C acima do ponto de fusão do lípido sólido, sendo ao mesmo tempo preparada a fase aquosa, composta pela água e pelo agente tensioativo, aquecida à mesma temperatura [276]. Depois, a fase aquosa é adicionada à fase lipídica sob agitação mecânica formando-se uma pré-emulsão, sendo esta sujeita a ultrasonicação, com vista a formar uma nanoemulsão [259]. O arrefecimento da nanoemulsão à temperatura ambiente leva à produção das nanopartículas lipídicas [259]. A variação do tempo, intensidade e frequências de ultrasonicação leva à obtenção de dispersões coloidais com propriedades físico-químicas distintas [259,330].

Na técnica da microemulsão a dispersão coloidal é constituída por 10-15% de conteúdo lipídico, 15-25% de agente tensioativo tipo O/A, 2-10% de agente tensioativo secundário (nem sempre necessário) e 50-70% de água [326]. Como facilmente se depreende, a preparação de nanopartículas lipídicas com recurso a esta técnica resume-se à fusão da fase lipídica e adição do fármaco, sendo simultaneamente aquecida à mesma temperatura a fase aquosa contendo o agente tensioativo tipo O/A, podendo também existir um agente tensioativo secundário [259,320,331]. A fase aquosa é

adicionada à fase lipídica na proporção entre 1:2 e 1:100, formando uma microemulsão com recurso a agitação mecânica, a qual é diluída em água fria sob agitação numa proporção entre 1:25 e 1:50, promovendo a formação da nanoemulsão [259,320]. A necessidade de utilizar tensioativos em elevada concentração é um fator contra, uma vez que existem tensioativos com efeitos tóxicos reportados [326].

O método da inversão de fase traduz-se na mistura, com recurso a agitação mecânica, da matriz lipídica, do fármaco e dos restantes componentes, a uma temperatura de 85°C [259,326,332,333]. Para que ocorra a inversão da emulsão, a mistura formada é sujeita a três ciclos de aquecimento/arrefecimento, elevação da temperatura a 85°C, seguido de arrefecimento até uma temperatura de 60°C, seguido de novo ciclo de aquecimento e arrefecimento às mesmas temperaturas e assim sucessivamente [326,332,333]. Este tratamento térmico faz-se com um gradiente térmico de 4°C/minuto [326,332,333]. De seguida, a esta fase é adicionada água arrefecida que provoca um choque térmico, proporcionando a formação das nanopartículas lipídicas [325,326,332,333].

No método de extrusão em membrana verifica-se a formação das nanopartículas fazendo passar a matriz lipídica previamente fundida, a uma temperatura superior à temperatura de fusão dos lípidos, por uma membrana sob pressão, formando gotículas de lípido líquido no interior dos poros da membrana [259,325,326,334,335]. Estas gotículas de lípido líquido são arrastadas do interior dos poros para a superfície da membrana com ajuda de um fluxo de fase aquosa tangencial ou transversal à superfície da membrana que circula no interior da membrana [259,326,334,335]. Estas gotículas de lípido líquido quando à superfície da membrana arrefecem e cristalizam, levando à formação das nanopartículas lipídicas [259,326,334,335].

Por sua vez, no método de emulsificação-evaporação do solvente verifica-se que a matriz lipídica é inicialmente dissolvida num solvente orgânico imiscível com a água (ex. clorofórmio, ciclohexano, etc.), sendo depois adicionada uma solução aquosa contendo um agente tensioativo do tipo O/A [259,325,326,330]. Esta mistura é sujeita a uma emulsificação sob agitação mecânica [259,325,326,330]. Com vista à obtenção das nanopartículas lipídicas, após a emulsificação ocorre a evaporação do solvente orgânico a pressão reduzida com a consequente precipitação dos lípidos no meio aquoso [325,326,330].

O método de substituição do solvente baseia-se na adição e dissolução da matriz lipídica num solvente orgânico semipolar miscível na água, como sendo o etanol, o metanol ou a acetona [259,325]. Após a dissolução, é adicionado o fármaco a esta fase, sendo que ao mesmo tempo é preparada a fase aquosa contendo um agente tensioativo

[259,325]. Seguidamente, por agitação mecânica, ocorre a emulsificação da fase orgânica na fase aquosa, ocorrendo a formação das nanopartículas lipídicas no momento em que o solvente orgânico passa para a fase aquosa, verificando-se a solidificação da matriz lipídica, sendo o processo finalizado com a remoção por destilação do solvente orgânico usado [259,325].

O método de emulsificação-difusão do solvente baseia-se na adição e dissolução da matriz lipídica num solvente orgânico parcialmente miscível na água, saturado com água antes da sua utilização (ex. álcool benzílico, tetrahidrofurano ou DMSO - dimetilsulfóxido) onde *à posteriori* é adicionado o fármaco [259,328]. Após esta fase, ocorre a emulsificação, sob agitação mecânica com uma fase aquosa que contém um agente tensioativo previamente adicionado [259,327]. A formação das nanopartículas lipídicas ocorre no exato momento em que, à pré-emulsão formada, lhe é adicionada água na proporção de 1:5 ou 1:10, ocorrendo a migração do solvente orgânico para a fase aquosa, sendo o processo finalizado com a remoção por destilação ou ultrafiltração do solvente orgânico usado [259,320].

O método dos fluídos supercríticos baseia-se na utilização de um solvente orgânico que auxilia a formação das nanopartículas lipídicas, sendo este solvente orgânico removido da nanoemulsão na etapa final mediante a utilização de CO<sub>2</sub> no estado supercrítico [259,336]. Define-se fluído supercrítico qualquer substância que foi pressurizada e aquecida acima da sua pressão e temperatura críticas, denominado ponto crítico termodinâmico, passando a ter propriedades simultâneas de um gás e de um líquido, ou seja, estes fluidos difundem-se como se de gases se tratassem e dissolvem outros materiais como se se tratassem de líquidos [329,336]. Como se verifica em muitos dos métodos referidos em que são utilizados solventes orgânicos, inicialmente verifica-se a adição e dissolução da matriz lipídica num solvente orgânico (ex. clorofórmio), sendo depois formada uma pré-emulsão com adição de uma fase aquosa contendo um agente tensioativo [259,336]. Na fase seguinte, a pré-emulsão é sujeita a HPH, formando-se uma nanoemulsão, sendo esta sujeita à já citada remoção do solvente orgânico [259,336].

#### 1.2.4.1.3.2.4 Desvantagens associadas às nanopartículas lipídicas

Apesar de todas as vantagens descritas, as nanopartículas lipídicas apresentam algumas desvantagens que podem afetar a sua estabilidade a longo prazo. A degradação do fármaco durante a preparação das nanopartículas (devido às temperaturas elevadas e à tensão de corte durante a HPH), as transformações polimórficas da matriz lipídica, a

gelificação ou ainda a existência de *supercooled melts*, são fenómenos que podem ocorrer nas nanopartículas lipídicas [259,280,331].

Para que ocorra a formação das nanopartículas lipídicas, a nanoemulsão formada tem que ser arrefecida obrigatoriamente a uma temperatura inferior ao ponto crítico de cristalização [259,325]. A temperatura de recristalização é inferior à temperatura de fusão, sendo a diferença entre estas temperaturas denominada de *supercooling* [259,325]. Formam-se *supercooled melts* quando a nanoemulsão, depois de formada, não é sujeita a uma temperatura inferior ao ponto crítico de cristalização, não se verificando desta forma, a formação das nanopartículas, permanecendo as gotículas lipídicas no estado líquido [259,280,325,337,338,339]. A temperatura de recristalização depende não só da natureza ou composição da matriz lipídica, como também do tipo de fármaco e dos agentes tensioativos utilizados [259,280,325,337,338,339].

Salienta-se também o facto de poderem existir rearranjos na estrutura cristalina da matriz lipídica das nanopartículas lipídicas ao longo do período de armazenamento, denominadas transformações polimórficas [259,280,325,338]. Estas alterações na estrutura cristalina têm por objetivo aumentar a estabilidade da estrutura lipídica nanométrica, podendo levar à expulsão do fármaco [259,280,325,338].

Por outro lado, as dispersões coloidais podem sofrer fenómenos de gelificação [259,280,325,340]. Este fenómeno é irreversível sendo provocado pela alteração da forma das nanopartículas, passando da forma tradicional esférica à forma de plaquetas, levando à agregação e ao aumento de tamanho das nanopartículas, com o consequente aumento da viscosidade da formulação [259,280,325,340]. A alteração da forma e do tamanho das nanopartículas faz com que o agente tensioativo presente em torno destas, e que lhes confere estabilidade, deixe de o fazer com eficácia, provocando a sua agregação [259,280,325,340]. Este tipo de fenómeno pode ser evitado ou limitado seleccionando agentes tensioativos adequados, devendo estes ser utilizados na quantidade apropriada [259,280]. A conservação da dispersão coloidal a temperaturas baixas também evita o aparecimento deste fenómeno [259,280].

#### 1.2.4.1.3.2.5 Exemplos da utilização de nanopartículas lipídicas em formulações oftálmicas tópicas

A Tabela VI mostra alguns exemplos da utilização de nanopartículas lipídicas em formulações oftálmicas tópicas.

**Tabela VI.** Exemplos da utilização de nanopartículas lipídicas em formulações oftálmicas de aplicação tópica.

Formulação Oftálmica	Resultados	Referência
Desenvolvimento e otimização de SLN (Compritol® ATO 888, Poloxamer® 188 e Tween® 80) encapsulando a ciclosporina A.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- A inclusão de dois tensoativos promoveu o aumento da estabilidade do sistema coloidal.</li> <li>- Estudos de citotoxicidade e de penetração celular realizados em linhas celulares epiteliais de córnea de coelho indicaram que as SLN preparadas não eram tóxicas e potenciaram a penetração e o <i>uptake</i> celular do fármaco.</li> </ul>	[268]
Preparação de NLC (Gelucire® 44/14, Compritol® ATO 888, Miglyol® 812, Cremphor® EL 40 e Transcutol® P) encapsulando o ibuprofeno.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- A adição de um promotor de penetração (Transcutol® P) e de mais um lípido sólido (Compritol® ATO 888) ao Gelucire® 44/14 promoveu um aumento do coeficiente de permeabilidade celular.</li> <li>- Quando comparada com a formulação convencional, esta promoveu um aumento da biodisponibilidade do fármaco de mais de 4 vezes.</li> </ul>	[317]
Preparação de NLC (Precifac® ATO 5, Miglyol® 840 e Tween® 80) revestidas pelo estearato de PEG tiolado veiculando a ciclosporina A.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Estudos <i>in vivo</i> realizados em coelhos demonstraram que as NLC revestidas apresentaram um maior tempo de retenção na superfície ocular (mais de 6 horas) e uma maior concentração de fármaco ao longo do tempo quando comparadas com as NLC sem revestimento.</li> <li>- O estearato de PEG tiolado, devido às suas propriedades mucoadesivas, aumentou a biodisponibilidade e eficácia terapêutica da ciclosporina A.</li> </ul>	[278]
Preparação de NLC (ácido esteárico, óleo de rícino e Tween® 80) encapsulando o flurbiprofeno.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> demonstraram que as NLC preparadas não são tóxicas para os tecidos oculares.</li> </ul>	[279]
Preparação de SLN (Precirol® ATO5, fosfolípido (emulsificante), Tween® 80 e PEG 400) encapsulando a metazolamida.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- A preparação de SLN encapsulando a metazolamida promoveu o aumento do tempo de residência da formulação na superfície ocular e promoveu a libertação prolongada do fármaco, potenciando o efeito terapêutico.</li> </ul>	[341]
Desenvolvimento de SLN (Triglicerídeos, fosfolípidos de soja SL-100, álcool anidro e Poloxamer® 188) veiculando a baicalina.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Quando comparada com a formulação convencional do referido fármaco, a preparação de SLN encapsulando a baicalina promoveu a libertação prolongada do fármaco, aumentando a concentração do fármaco nos tecidos oculares, potenciando a eficácia terapêutica.</li> </ul>	[342]
Preparação de NLC (Compritol® 888 ATO, Miglyol® 812N, Gelucire® 44/14, Glicerol, Solutol® HS-15 e Tween® 80) revestidas por quitosano oligossacarídeo (COS) encapsulando o flurbiprofeno.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- As NLC foram revestidas com COS (quitosano oligossacarídeo) em diferentes concentrações, nomeadamente, 0,1, 0,3, 0,5 e 1% (m/m).</li> <li>- As NLC revestidas com o polímero mucoadesivo (COS) aumentaram drasticamente o tempo de residência da formulação na zona pré-corneal,</li> </ul>	[273]



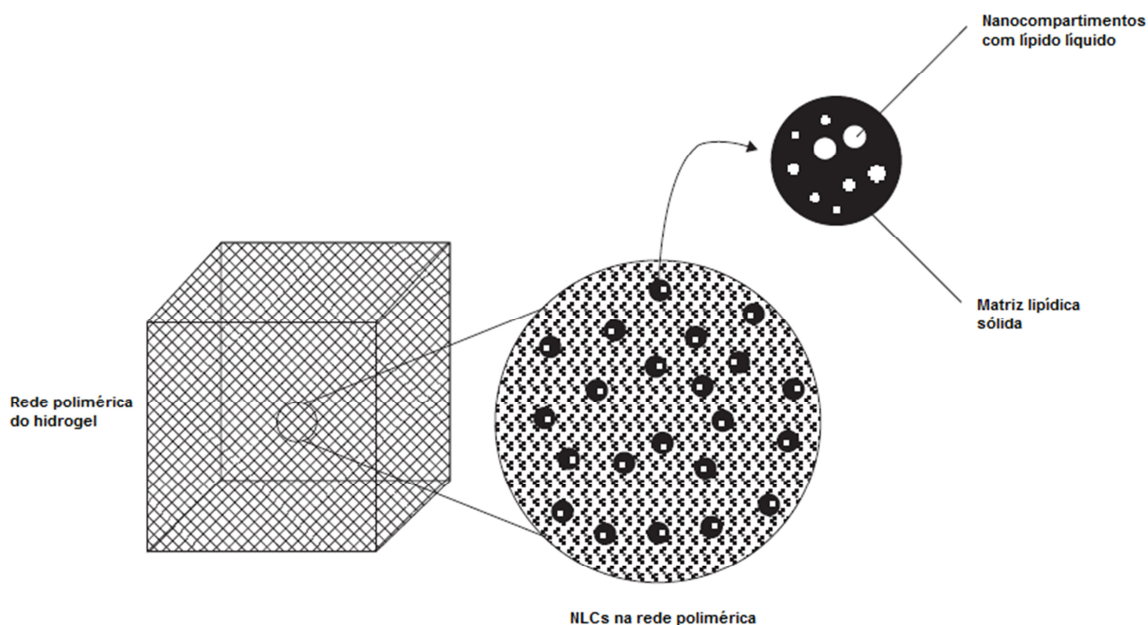
	diminuindo a eliminação da formulação pelos mecanismos de defesa do globo ocular, potenciando também a penetração através dos tecidos, quando comparadas com as NLC não revestidas.	
Preparação de NLC (Compritol® 888 ATO ou ácido esteárico, Miglyol® 812 e óleo de rícino, Tween® 80) encapsulando o flurbiprofeno.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- As formulações demonstraram uma liberação prolongada do flurbiprofeno.</li> <li>- A adição do hidrogel de carbómero (PFC) à dispersão coloidal promoveu um aumento da viscosidade, apresentando a formulação final um comportamento pseudoplástico sem tixotropia, ideal para a aplicação ocular tópica.</li> <li>- Estudos <i>ex vivo</i> realizados em córnea de coelho demonstraram um aumento da permeação transcorneal do flurbiprofeno, enquanto estudos <i>in vivo</i> demonstraram uma elevada tolerância ocular.</li> </ul>	[343]

#### 1.2.4.1.3.2.6 Desenvolvimento de formulações oftálmicas usando uma combinação de nanopartículas e polímeros sensíveis a estímulos

Apesar de todas as vantagens, as dispersões coloidais apresentam baixos valores de viscosidade, o que provoca uma rápida eliminação da formulação dos tecidos oculares, reduzindo a sua eficácia terapêutica [343,344]. Esta é a maior desvantagem deste tipo de sistema terapêutico, podendo ser facilmente ultrapassado com a adição de agentes viscosificantes ou polímeros sensíveis a estímulos [81,343].

São vários os estudos que têm sido efetuados com o objetivo de aumentar o tempo de residência pré-corneal das dispersões coloidais, recorrendo ao revestimento, à suspensão ou à dissolução das nanopartículas em polímeros mucoadesivos ou polímeros sensíveis a estímulos [19,29,33,34,71,81,85,137,247,303,304,308,343,345-347]. Estes polímeros além de poderem sofrer transições sol-gel na presença das características físico-químicas específicas dos tecidos oculares, podem conferir carga elétrica positiva às nanopartículas ou estabelecer interações (pontes de hidrogénio ou interações eletrostáticas) com substâncias existentes nos tecidos oculares, como por exemplo a mucina, tal como referido anteriormente [25,81,278,295,302,345,347].

A adição de polímeros mucoadesivos, polímeros sensíveis a estímulos ou agentes viscosificantes não só aumenta a viscosidade e as características mucoadesivas da formulação como também promove o aumento da estabilidade das dispersões coloidais, combinando no mesmo sistema terapêutico as vantagens dos polímeros adicionados e das dispersões coloidais [8,81,95,274,343,348-352].



**Figura 7.** Representação esquemática das NLC dispersas na rede polimérica de um hidrogel (adaptado com permissão de Doktorovova e Souto, (2009) [314], disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17425240802712590#abstract>).

Como referido anteriormente, os polímeros sensíveis a estímulos podem ser utilizados em sistemas coloidais com o objetivo de aumentar o tempo de residência da formulação oftálmica na superfície ocular por aumento da viscosidade da formulação, uma vez que, estes polímeros na presença das características físico-químicas específicas dos tecidos oculares, como sendo a temperatura, o pH e a força iónica sofrem transição sol-gel [25,29,71,85,93,102,103,110,112,120,126,137,242,245,293,303,304,353,354].

Normalmente estes sistemas são preparados em separado, sendo misturados *a posteriori*. Neste caso é fundamental que os polímeros sensíveis a estímulos sejam adicionados numa concentração tal que a transição sol-gel ocorra imediatamente após o contacto da formulação com a superfície ocular, otimizando a biodisponibilidade do fármaco ocular [14,15,19,81,303,304].

Diferentes autores já procederam à adição de polímeros a dispersões coloidais chegando à conclusão que é notório o aumento da eficácia terapêutica da formulação resultante [283,303,304,344,348-352]. Gupta *et al.* (2013) [304] prepararam nanopartículas poliméricas de PLGA encapsulando a levofloxacina e os mesmos autores prepararam também nanopartículas poliméricas de PLGA encapsulando a sparfloxacina. Em ambos os estudos as nanopartículas poliméricas foram dispersas num hidrogel de

quitosano. Os resultados obtidos indicaram que se registou um aumento no tempo de retenção da formulação na superfície ocular, não só pela gelificação do hidrogel de quitosano ao entrar em contacto com o pH da superfície ocular, mas também devido às interações eletrostáticas que se estabelecem entre o quitosano e a mucina [303,304]. Seguindo o mesmo princípio Abrego *et al.* (2015) [355] prepararam nanopartículas poliméricas de PLGA encapsulando o pranoprofeno, dispersas num hidrogel de Carbopol® 934. A inclusão das nanopartículas num hidrogel de Carbopol® promoveu não só o aumento do tempo de retenção da formulação na superfície ocular como também um aumento da eficácia terapêutica, tendo esta sido demonstrada em estudos de permeação corneal *ex vivo* e em estudos *in vivo* de eficácia anti-inflamatória [355].

#### 1.2.4.1.3.2.7 Aspetos críticos a considerar no desenvolvimento de formulações baseadas na combinação de nanopartículas com polímeros sensíveis a estímulos

As formulações oftálmicas devem ser preparadas de forma a não provocar lacrimação, irritação ocular, visão turva, devendo promover o mínimo de desconforto e interferência ao movimento do globo ocular e ao pestanejar. Desta forma, as formulações oftálmicas resultantes da combinação de dispersões coloidais com polímeros sensíveis ao pH devem ser: estéreis, isotónicas, com valores de pH próximos do pH fisiológico, com um comportamento reológico não Newtoniano (pseudoplástico) e devem ser mucoadesivas [14,15,19,38,66,356,357].

A preparação de formulações oftálmicas estéreis, isotónicas e com valores de pH próximo do valor de pH fisiológico tem por objetivo principal evitar a irritação e a sensação de desconforto ocular. De salientar que apesar de ser aconselhado que o valor de pH seja próximo de 7,4, existe bibliografia que descreve que, a utilização de formulações oftálmicas com valores de pH entre 4-8,5 não promove qualquer tipo de lesão ocular, lacrimejar ou sensação de desconforto [52,278,356,357,358]. O comportamento reológico do sistema terapêutico deve ser não Newtoniano (pseudoplástico), de forma que a viscosidade diminua com o aumento da velocidade de corte, oferecendo pouca resistência ao movimento da pálpebra e do globo ocular, limitando a sensação de desconforto [32,38].

As nanopartículas preparadas devem apresentar um tamanho entre 50 e 400 nm, de forma que as propriedades bioadesivas associadas a este tipo de sistemas nanométricos possam potenciar a absorção e a penetração do sistema terapêutico através dos tecidos oculares [46,267].

## 2. Materiais e métodos

Neste capítulo, e para uma melhor compreensão do trabalho experimental desenvolvido, descreve-se inicialmente com detalhe, o procedimento geral da preparação das nanopartículas lipídicas (NLC) e dos hidrogéis produzidos com recurso a polímeros sensíveis a estímulos (hidrogéis de PF 127 e Quitosano), bem como a adição destes polímeros às dispersões coloidais. Descrevem-se também os métodos experimentais utilizados para a caracterização das formulações preparadas bem como os parâmetros relevantes utilizados para a otimização dos métodos descritos.

### 2.1 Matérias-primas e reagentes

O Precirol® ATO 5 (PRE), o Gelucire® 44/14, o Gelucire® 43/01, o Gelucire® 50/13, o Compritol 888 ATO (COMP), o Lipocire® DM e o palmitato de cetilo foram oferecidos pela empresa Gattefossé (França). A empresa Cremer Oleo GmbH & Co. KG (Alemanha) ofereceu os lípidos Imwitor® 900K e Imwitor® 491 e a empresa Sasol (Alemanha) doou os produtos Witepsol® E85, Dynasan® 114, Dynasan® 118, Softisan® 142 e Softisan® 645.

O ibuprofeno (IBU) e a hidrocortisona (HdC) foram adquiridos à empresa Fagron® (Espanha). O brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB), o Nipagin M, o ácido acético glacial ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), o dihidrogenofosfato de sódio monohidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), o laurilsulfato de sódio (SDS) e o fosfato dissódio anidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) foram adquiridos à empresa J.M. Vaz Pereira S.A. (Portugal). O hidróxido de sódio (NaOH) utilizado nos ensaios foi adquirido à empresa Prolabo (França).

O Tween® 80, o Pluronic® F-127, o D-manitol, o quitosano (CS) e a mucina de estômago de porco do tipo II foram adquiridos à empresa Sigma-Aldrich® (Portugal). A lisozima (derivada da clara do ovo da galinha) foi comprada à empresa Fluka (Sigma-Aldrich®, Portugal).

O ácido esteárico, o perhidrosqualeno, o cloreto de potássio (KCl), a glicerina, a solução de Sorbitol a 70% e o propilenoglicol foram adquiridos à Acofarma® (Espanha). O Kolliphor® P188, Lutrol® F-127 (LF-127) e Lutrol® F-108 (LF-108) foram adquiridos pela empresa Basf® (Alemanha) e o Miglyol® 812 foi comprado à empresa Oxi-Med express, S.A. (Espanha).

O cloreto de cálcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) foi adquirido à Merck® (Alemanha), o cloreto de sódio (NaCl) e o bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) foram comprados à Panreac®

(Espanha). A água utilizada nos trabalhos experimentais foi purificada através de um sistema de purificação de água denominado Millipore Direct-Q® UV-R 3 (França).

A linha celular do retinoblastoma humano Y-79 foi comprada à empresa CLS Cell Lines Service GmbH (Alemanha). O AlamarBlue® foi adquirido à empresa Life Technologies Europe BV (Portugal). Os reagentes utilizados na cultura das células, incluindo o meio de cultura RPMI 1640 com GlutaMAX™, o tampão DPBS, o soro fetal bovino inativado pelo calor (FBS) e os antibióticos (10000 U/mL penicilina, 10000 µg/mL estreptomicina) foram comprados à Gibco Laboratories (Alfagene, Invitrogene, Portugal).

Os ovos fecundados de galinha Leghorn Shaver Starcross 288 foram adquiridos à empresa Granja Santa Isabel (Espanha).

## 2.2 Equipamento

- Agitador em hélice - Heidolph RZR 2041 (Alemanha);
- Aparelho de dissolução - Sotax AT7 (Suíça);
- Balanças - Kern PBF 2000-2 com uma precisão de 0,01 g (Alemanha); OHAUS Explorer® Pro EP 612 com uma precisão de 0,01 g (USA); Kern ABT 120 5DM com uma precisão de 0,0001 g (Alemanha) e Mettler Toledo AG245 com uma precisão de 0,0001 g (Suíça);
- Banho de água – Nahita de 5 litros (Espanha);
- Banho de ultrassons - Bandelin electronic D-1000 Berlin 45 RK100H (Alemanha);
- Calorímetro diferencial de varrimento (DSC) - Netzsch DSC 200 F3 Maia® NETZSCH-Gerätebau GmbH (Alemanha);
- Câmara de fluxo laminar - Heraeus Hera Safe HS 12 (Alemanha);
- Centrífuga - ThermoFisher Scientific Heraeus Multiuge X1R (Alemanha);
- Dispersão dinâmica da luz (DLS) - Zetasizer Nano-ZS Malvern Instruments (Reino Unido);
- Difratómetro Laser, Mastersizer 3000 (Reino Unido)
- Espectrofotómetro UV-VIS - JASCO V-650 (Japão);
- Estabilidade Ótica de dispersões - Turbiscan LAB Expert®, Formulaction (França);
- Estufa - Memmert (Alemanha);
- Incubadora - Thermo Scientific HeraCell 150i (USA);
- Leitor de microplacas de fluorescência (BioTek Instruments, Vermont, USA)

- Microscópio Eletrónico de Varrimento de Alta Resolução a baixa temperatura (cryoSEM) - JEOL JSM 6301F (JEOL, Japão)/ INCA Energy 350 (Oxford Instruments, Reino Unido)/ Alto 2500 (Gatan, USA);
- Microscópio ótico Nikon TS 100F equipado com câmara digital DS-Fi1 (Japão);
- Misturador Unguator® Ruhrwerks (Alemanha);
- Osmómetro - Micro-Osmometer Automatic Type 15 Löser Messtechnik (Alemanha);
- Placa de agitação com aquecimento - Heidolph MR Hei-Tec (Alemanha); Stuart Scientific SM26 (Reino Unido);
- Potenciómetro - Crison® Basic 20 (Espanha);
- Sonda de sonicação - Sonics & Materials Inc. Vibra Cell™ VCX 130 Model CV 18 (USA);
- Texturómetro - TA-XT2i Texture Analyzer Stable Micro Systems (Reino Unido);
- Ultra-Turrax T25 Janke & Kunkel IKA® (Alemanha);
- Viscosímetro - Thermo Haake VT-550 type Searle (Alemanha);

## 2.3 Métodos

### 2.3.1 Estudo da compatibilidade e da solubilidade lipídica

De forma a preparar nanopartículas lipídicas com elevada eficácia de encapsulação e estáveis a longo prazo é necessário avaliar a compatibilidade e a solubilidade entre os lípidos (sólidos e líquidos) escolhidos, e entre os lípidos selecionados e o fármaco [276,316,319,321]. O método escolhido para efetuar este estudo de solubilidade lipídica foi efetuado de acordo com os autores Silva *et al.* (2011) [276], Silva *et al.* (2012) [316] e Mendes *et al.* (2013) [319], tendo sido introduzidas algumas alterações. Desta forma, foi efetuada uma pesquisa bibliográfica sobre a compatibilidade e solubilidade entre os lípidos sólidos e líquidos e entre os lípidos e o fármaco escolhido. Assim, a solubilidade entre os lípidos sólidos selecionados e o fármaco em diferentes concentrações (0,1, 0,2 ou 1% m/m), foi efetuada fundindo cada um dos lípidos sólidos a uma temperatura de 80°C durante uma hora sob constante agitação. Após a fusão do lípido sólido foi adicionado o fármaco.

Por outro lado, a solubilidade dos lípidos líquidos com o ibuprofeno foi efetuada adicionando o fármaco a diferentes concentrações (0,1, 0,2 ou 1% m/m) nos lípidos

líquidos selecionados sob agitação constante (450 rpm). A ausência de cristais do fármaco na matriz lipídica indica a solubilização do fármaco nos lípidos selecionados.

Com o mesmo intuito, foi avaliada a miscibilidade entre os lípidos sólidos e os lípidos líquidos que solubilizaram o fármaco selecionado. O ensaio foi efetuado misturando o lípido sólido com o lípido líquido nas proporções de 90:10, 80:20, 70:30, 60:40 % (m/m). A matriz lipídica foi aquecida elevando a temperatura até 70°C, durante uma hora, sob uma constante agitação de 250 rpm. Após o período de tempo referido, a matriz lipídica foi arrefecida à temperatura ambiente, tendo sido verificada a presença ou ausência de gotículas lipídicas [319,359]. Para uma fácil visualização procedeu-se ao espalhamento da matriz lipídica solidificada num papel de filtro [319,359]. Desta forma, a ausência de gotículas lipídicas indicia a completa miscibilidade e compatibilidade entre os lípidos sólidos e os lípidos líquidos escolhidos. Os resultados da solubilidade lipídica foram posteriormente confirmados recorrendo à calorimetria diferencial de varrimento (DSC).

### 2.3.2 Preparação das nanopartículas lipídicas (vetores lipídicos nanoestruturados - NLC)

Os NLC foram preparados recorrendo à técnica de emulsificação e ultrasonicação [276]. A fase lipídica composta pelo lípido sólido e pelo lípido líquido foi aquecida 5 a 10°C acima do ponto de fusão do lípido sólido. A esta temperatura e depois da fusão do lípido sólido foi adicionado o fármaco. Ao mesmo tempo, a fase aquosa composta pelo Tween<sup>®</sup> 80 (tensioativo), brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB) (conservante) e água ultrapura foi aquecida à mesma temperatura sob agitação constante. De forma a obter uma pré-emulsão, a fase aquosa foi adicionada lentamente à fase lipídica, sendo sujeita a uma agitação a alta velocidade utilizando o Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel IKA<sup>®</sup> Labortechnik, Germany) a 8000 rpm durante 5 minutos.

Com o objetivo de obter uma nanoemulsão O/A, a pré-emulsão foi sujeita a um processo de elevada energia, ou seja, ultrassons, de forma que as gotículas lipídicas quebrassem e adquirissem tamanhos nanométricos, utilizando para isso uma sonda de sonicação de 6 mm de diâmetro (Sonics & Materials Inc. Vibra Cell<sup>™</sup> VCX 130 Model CV 18, USA) com uma amplitude energética de 70% durante 15 minutos.



**Figura 8.** Ilustração dos equipamentos necessários para a preparação dos NLC, o Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel IKA® Labortechnik, Germany) e a sonda de sonicação (Vibra Cell™ VCX 130 Model CV 18, USA).

De forma a obter os NLC, a nanoemulsão foi transferida para um frasco de vidro rolhado, promovendo o arrefecimento à temperatura ambiente para que a matriz lipídica solidificasse e permitisse a formação dos NLC. Após o arrefecimento, os NLC preparados foram armazenados no frigorífico a 4°C.



**Figura 9.** Aspeto final da dispersão coloidal NLC contendo 0,1% (m/m) de Ibuprofeno.



### 2.3.3 Preparação dos hidrogéis

#### 2.3.3.1 Preparação dos hidrogéis de LF-127 e LF-108 para aplicação dérmica

Os hidrogéis foram obtidos a partir dos polímeros termossensíveis LF-127 ou LF-108, tendo sido preparados pelo designado método a frio [71,153,160]. Assim, uma determinada quantidade de polímero foi disperso em água purificada ou ultrapura (no caso das formulações oftálmicas) fria usando um agitador em hélice (Heidolph RZR 2041, Alemanha) a uma rotação de 750 rpm, em banho de gelo.



**Figura 10.** Preparação dos hidrogéis de poloxâmero pelo método a frio.

O tempo de preparação está dependente da completa dispersão do polímero na água. Os hidrogéis resultantes foram colocados no frigorífico a uma temperatura de 4°C por um período de 48 horas para que se dissipassem as bolhas de ar formadas durante a agitação.

No caso dos hidrogéis de LF-127 (20% m/m e 30% m/m) ou de LF-108 (20% m/m) desenvolvidos para aplicação tópica veiculando o ibuprofeno (IBU) (5% m/m) ou a hidro cortisona (HdC) (1% m/m), as amostras após as 48 horas no frigorífico foram colocadas numa estufa a 37°C durante 24 horas de forma a adquirirem consistência semissólida. Decorrido o referido tempo e com o objetivo de aumentar a estabilidade dos hidrogéis foi adicionado o Nipagin (0,1% m/m) recorrendo ao Unguator® (Ruhrwerks, Alemanha), sob agitação a baixa velocidade durante um minuto. Os diferentes fármacos foram incorporados nos diferentes hidrogéis da mesma forma e nas mesmas condições, recorrendo ao Unguator® (Ruhrwerks, Alemanha), sendo as formulações finais

armazenadas na estufa a 37°C. A Figura 11 ilustra a incorporação do fármaco no hidrogel de poloxâmero recorrendo ao Unguator®.



**Figura 11.** Incorporação do fármaco e do Nipagin no hidrogel de poloxâmero recorrendo ao Unguator® (Ruhrwerks, Alemanha).

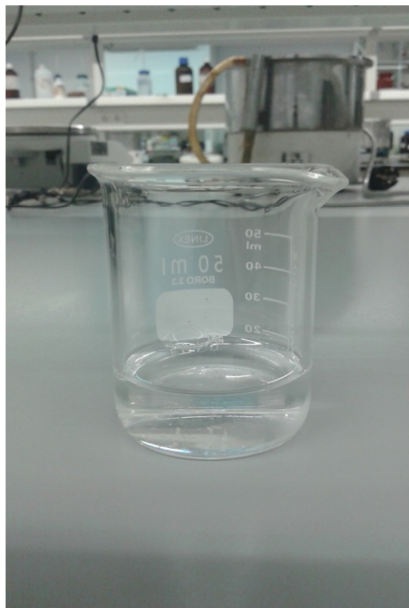


**Figura 12.** Aspeto final do hidrogel de LF 108 20% (m/m) com ibuprofeno 5% (m/m).

#### 2.3.3.2 Preparação dos hidrogéis de PF 127 para aplicação oftálmica

Foram preparados hidrogéis de PF127 (9, 12, 15 e 18%, m/m) pelo método a frio [71,153,160]. Os hidrogéis foram obtidos através da dispersão simples do polímero PF 127 em água ultrapura fria sob agitação constante a 750 rpm, usando um agitador em hélice (Heidolph RZR 2041, Alemanha) e um banho de gelo. Após a dispersão completa do polímero, e nas mesmas condições descritas anteriormente, foi adicionado o CTAB

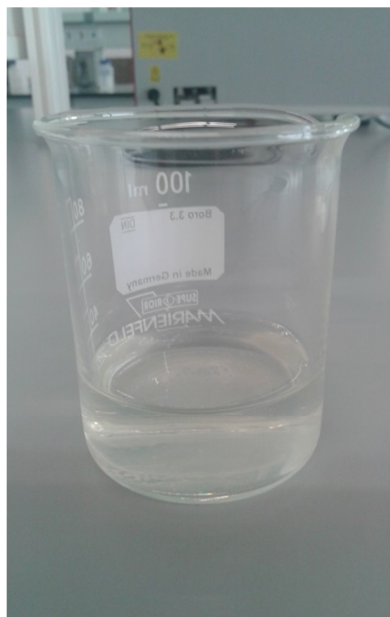
(0,5%, m/m) e o ibuprofeno (0,1%, m/m). Os diferentes hidrogéis oftálmicos de PF 127 contendo ibuprofeno foram armazenados no frigorífico a 4°C.



**Figura 13.** Aspeto final do hidrogel oftálmico preparado com o PF 127 15% (m/m) e 0,1% (m/m) de ibuprofeno.

#### 2.3.3.3 Preparação dos hidrogéis de quitosano

Para preparar os hidrogéis de quitosano usados nas formulações oculares, inicialmente foi preparado ácido acético glacial a 0,5% (m/m) em água ultrapura. O quitosano foi disperso a diferentes concentrações (0,7%, 1,0%, 1,3%, m/m) no ácido acético preparado anteriormente, sob agitação vigorosa. Os hidrogéis resultantes foram armazenados no frigorífico a 4°C durante 24 horas.



**Figura 14.** Aspeto final do hidrogel de quitosano 1% (m/m) preparado em ácido acético glacial 0,5% (m/m).

#### 2.3.3.4 Preparação dos hidrogéis de PF 127 e quitosano contendo NLC

Nos NLC de aplicação oftálmica em que foi adicionado somente o polímero termossensível PF 127, a dispersão foi efetuada de acordo com o método a frio [71,153,160]. Desta forma, 24 horas após a preparação dos NLC, uma determinada quantidade de PF 127 foi dispersa na dispersão coloidal recorrendo a um agitador em hélice (Heidolph RZR 2041, Alemanha) a uma rotação de 400 rpm, em banho de gelo [149,150]. As formulações NLC-PF127, com diferentes concentrações de polímero termossensível (9, 12, 15 e 18% m/m), foram colocadas no frigorífico a uma temperatura de 4°C por um período de 48 horas, para que se dissipassem as bolhas de ar formadas durante a agitação.



**Figura 15.** Aspeto final dos NLC com 0,1% (m/m) de ibuprofeno contendo PF 127 15% (m/m).

Nas formulações oftálmicas preparadas com NLC, quitosano e PF 127, a adição do hidrogel de quitosano efetuou-se 24 horas após a preparação do hidrogel de quitosano e dos NLC. Assim, o hidrogel de quitosano (a diferentes concentrações 0,7%, 1,0% e 1,3%, m/m) foi disperso em igual volume de dispersão coloidal, sob agitação constante usando o agitador em hélice Heidolph RZR 2041 (Alemanha) [273]. Depois do hidrogel estar completamente disperso na dispersão coloidal (formulação NLC-CS), uma determinada quantidade de polímero PF 127 foi dispersa na formulação NLC-CS recorrendo ao método a frio, usando um agitador em hélice (Heidolph RZR 2041, Alemanha) a uma rotação de 400 rpm, em banho de gelo [71,149,150,153,160]. A Figura 16 ilustra o aspeto final dos hidrogéis NLC-CS (A) e NLC-CS+PF127 (B).



**Figura 16.** Aspeto final dos hidrogéis NLC-CS (A) e NLC-CS+PF127 (B).

As formulações NLC-CS+PF127, com diferentes concentrações de quitosano e com diferentes concentrações de polímero termossensível PF 127 foram colocadas no frigorífico a uma temperatura de 4°C por um período de 48 horas.

#### 2.3.4 Caracterização das dispersões coloidais

##### 2.3.4.1 Determinação do tamanho das partículas, índice de polidispersão e potencial zeta

A determinação das propriedades físico-químicas das nanopartículas é fundamental para se poder caracterizar uma dispersão coloidal. Assim, o tamanho das partículas expresso como Z-ave, a distribuição do tamanho das partículas expressa como índice de polidispersão (PI) e a carga elétrica da superfície das nanopartículas expressa como potencial zeta (ZP) foram determinados através da técnica de dispersão dinâmica da luz (DLS), também conhecida como espectroscopia de correlação de fótons (PCS), usando o equipamento Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Reino Unido). Estes parâmetros podem condicionar a eficácia terapêutica da forma farmacêutica e também, afectar estabilidade física da dispersão coloidal. O DLS é uma técnica não invasiva que avalia o tamanho das partículas e a sua distribuição medindo a flutuação da intensidade da luz dispersa pelas partículas em função do tempo [279,319].





**Figura 17.** Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Reino Unido).

As partículas existentes numa dispersão coloidal apresentam movimentos brownianos. O movimento browniano, fenómeno físico intrínseco à matéria, sendo caracterizado pelo movimento aleatório das partículas em suspensão num fluido, em resultado da colisão entre todas as moléculas ou átomos presentes no fluido. Este movimento das partículas faz com que um feixe de luz que incida sobre as partículas seja disperso com intensidades diferentes. Este efeito ótico denomina-se efeito de Tyndall, e baseia-se na dispersão da luz pelas partículas existentes em suspensão numa dispersão [275]. A análise das flutuações de intensidade em função da velocidade do movimento browniano (partículas de grandes dimensões movem-se lentamente provocando uma menor flutuação na intensidade da luz dispersa, enquanto as partículas de pequenas dimensões apresentam velocidades de movimento browniano superiores, produzindo flutuações maiores na intensidade da luz dispersa) permite determinar o tamanho de partícula usando a relação Stokes-Einstein.

A homogeneidade da distribuição de tamanhos das partículas de uma determinada dispersão coloidal é tanto maior quanto menor for o seu valor. Este valor traduz a variação do tamanho das nanopartículas em torno de um diâmetro médio [314]. Assim, na presença de valores de PI de 0,000, as dispersões coloidais são consideradas dispersões idealmente monodispersas [328,360]. Por sua vez, se os valores de PI são inferiores a 0,300, as dispersões coloidais são considerados monodispersões com propriedades aceitáveis, enquanto que, dispersões coloidais com valores de PI superiores a 0,300 são consideradas dispersões coloidais muito amplas, com presença de micropartículas [328,360].

O potencial zeta refere-se à carga elétrica que a superfície de uma partícula adquire num determinado meio, sendo dependente do pH, da força iônica e/ou da concentração de um determinado componente [275]. Este parâmetro mede o movimento das partículas quando sujeito a um determinado campo elétrico (mobilidade eletroforética) dando indicações claras sobre a estabilidade das dispersões coloidais [275,314]. Valores de ZP superiores  $\pm 30$  mV evitam fenômenos de precipitação ou coagulação das nanopartículas, sendo as dispersões coloidais consideradas estáveis. Os movimentos brownianos característicos das partículas dispersas em suspensão, aliados à carga elétrica existente à superfície das partículas, fazem com que as partículas não precipitem, agreguem ou coagulem, existindo em suspensão na dispersão [275].

Para aplicação oftálmica, as nanopartículas devem apresentar um tamanho inferior a 400 nm (conferindo propriedades bioadesivas, podendo penetrar através dos tecidos oculares), serem monodispersões com um PI inferior a 0,3, tendo que apresentar um potencial zeta positivo e superior a 30 mV, de forma que as nanopartículas possam estabelecer interações eletrostáticas com a carga negativa dos tecidos oculares, conferindo também estabilidade à dispersão coloidal [32,39,45,46,264,272].

Para que as medições destas propriedades fossem possíveis, as dispersões coloidais foram dispersas em água ultrapura (1:100) de forma a eliminar a dispersão múltipla da luz causada pela elevada concentração de partículas. As amostras de dispersões sólidas contendo polímero sensíveis a um estímulo foram sujeitas a uma breve sonicação antes das medições, de forma a provocar a destruição da rede polimérica do hidrogel [319,361]. As medições foram efetuadas a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , sendo as medições realizadas 8 dias após a preparação dos NLC e estando as amostras armazenadas no frigorífico a  $4^\circ\text{C}$  durante este período de tempo. Os diferentes resultados foram expressos como média  $\pm$  DP (realizados em triplicado). Todos os cálculos estatísticos foram efetuados com o software “GraphPad Prism 6.00 for Windows” (GraphPad Software, San Diego, California, USA). As comparações estatísticas foram efetuadas recorrendo ao Two-way ANOVA, seguido do *Tukey's multiple comparisons test*. Em todos os casos, valores de  $p < 0,05$  foram considerados diferenças significativas.

#### 2.3.4.2 Determinação da morfologia das nanopartículas por microscopia eletrónica de varrimento de alta resolução a baixa temperatura (cryoSEM)

A morfologia da superfície das nanopartículas com ou sem polímero sensível a estímulos foi avaliada por microscopia eletrónica de varrimento de alta resolução a baixa



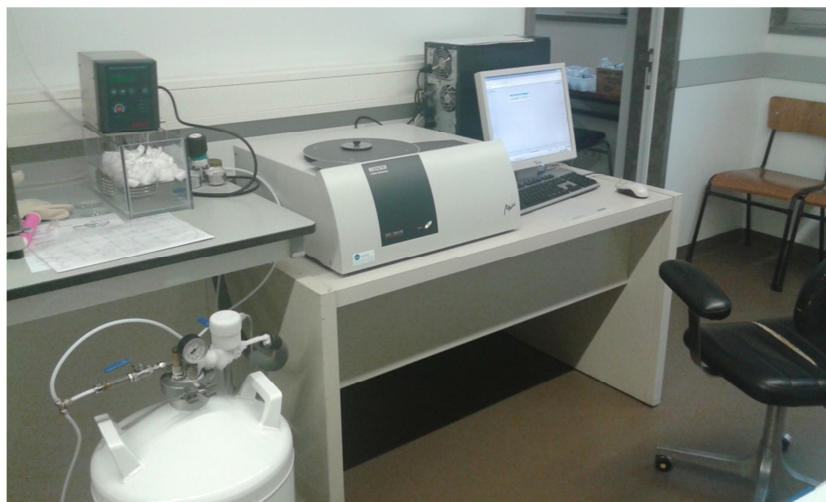
temperatura (cryoSEM) com Microanálise por Raios X e sistema para observação de amostras a baixa temperatura: JEOL JSM 6301F (JEOL, Japão)/ INCA Energy 350 (Oxford Instruments, Reino Unido)/ Alto 2500 (Gatan, USA). O cryoSEM é uma técnica visual capaz de dar informações sobre o tamanho médio e a morfologia da superfície das partículas. Nesta técnica, as amostras foram colocadas sobre uma grelha, sendo arrefecidas rapidamente, mergulhando a amostra em azoto líquido subarrefecido. Depois desta fase inicial e sob condições de vácuo, as amostras foram transferidas para a câmara de preparação com a platina arrefecida. Nesta câmara, as amostras foram fraturadas e sublimadas a uma temperatura de  $-90^{\circ}\text{C}$  durante 60 segundos, sendo revestidas por uma liga de ouro-paládio por pulverização iónica durante 40 segundos.

Por fim, sob condições de vácuo, as amostras foram transferidas para a câmara do SEM, tendo sido efetuada a observação das amostras a uma temperatura de  $-150^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.3.4.3 Análise térmica por calorimetria diferencial de varrimento (DSC)

A calorimetria diferencial de varrimento (DSC) é uma técnica utilizada em estudos de pré-formulação com o objetivo de estudar e caracterizar o comportamento térmico de compostos utilizados em formas farmacêuticas [275,276,281,307,319,344]. Esta técnica permite determinar o comportamento de fusão, recristalização, entalpias de reação e de transição, transições vítreas, polimorfismos, estabilidade oxidativa, dessolvatação, determinação da decomposição e da pureza [275,276,281,307,319,344]. Todas estas características afetam as propriedades físico-químicas e a estabilidade das dispersões coloidais. Assim, recorrendo ao estudo do comportamento térmico por DSC, é possível determinar as interações entre compostos. Desta forma, esta técnica foi utilizada para confirmar a compatibilidade e a solubilidade entre os lípidos selecionados e o ibuprofeno [276].

Os ensaios foram efetuados usando o calorímetro diferencial de varrimento Netzsch DSC 200 F3 Maia<sup>®</sup> (NETZSCH-Gerätebau GmbH, Alemanha) em atmosfera inerte de nitrogénio seco com um caudal de 20 mL/min. Inicialmente, o sistema calorimétrico foi calibrado com o padrão Índio (NETZSCH-Gerätebau GmbH, Alemanha).



**Figura 18.** Calorimetria diferencial de varrimento (DSC) - Netzsch DSC 200 F3 Maia® (Alemanha).

As amostras foram colocadas em cadinhos de alumínio (sem furo no topo) com um volume de 40  $\mu\text{L}$ , sendo usado como referência um cadinho de alumínio vazio. Desta forma, foram analisadas 2 a 3 mg de cada uma das matérias-primas puras, as misturas físicas dos diferentes lípidos com o fármaco e os diferentes NLC preparados, com e sem fármaco, antes e depois da incorporação de polímeros sensíveis a estímulos (quantidade equivalente de lípido formulado como NLC). A análise térmica iniciou-se com a fase de *stand-by* a 20°C, seguindo-se um arrefecimento da amostra a 5°C a um gradiente de 10°C/min. De seguida, procedeu-se a uma fase de aquecimento dos 5°C aos 85°C a um gradiente de 5°C/min, finalizando com uma fase de arrefecimento até à temperatura de 25°C a um gradiente de 5°C/min.

O equipamento possui um software específico denominado Proteus® Software Version 4.8.4 (NETZSCH-Gerätebau GmbH, Alemanha) onde é possível verificar os diferentes fenómenos ocorridos durante o ensaio, incluindo a temperatura de fusão, as variações de entalpia, entre outros.

#### 2.3.4.4 Determinação da eficácia de encapsulação e da capacidade de carga dos NLC

A eficácia de encapsulação (EE) dos NLC traduz-se na quantidade de fármaco encapsulado relativamente à quantidade total de fármaco adicionado, enquanto a capacidade de carga (LC) das NLC traduz-se na quantidade de fármaco encapsulado em relação à fase lipídica [314,319].

A eficácia de encapsulação (EE) e a capacidade de carga (LC) do ibuprofeno nos NLC foi avaliada de forma indireta, calculando a quantidade de fármaco existente na fase aquosa da dispersão coloidal. Assim, uma determinada quantidade da dispersão de NLC foi diluída em solução tampão fosfato pH 7,4 na proporção de 1:10, sendo sujeita a uma ligeira agitação constante durante 10 minutos. Esta fase inicial serve para remover o ibuprofeno não encapsulado e que se encontra depositado à superfície dos NLC [271].

Depois desta fase, a amostra diluída foi sujeita à técnica de filtração/centrifugação usando dispositivos filtrantes (tubos de centrifuga especiais com uma membrana filtrante) Ultracel-10K (Amicon®, Millipore Corporation, Irlanda) com um tamanho de poro nominal de 10000 NMWL (limite nominal de peso molecular), sujeitos a centrifugação a uma rotação de 3500 rpm durante 1 hora, usando a centrífuga ThermoFisher Scientific Heraeus Multiuge X1R (Alemanha). O ibuprofeno não encapsulado presente na solução aquosa da dispersão coloidal passa pela membrana, enquanto o ibuprofeno encapsulado nos NLC fica retido na membrana filtrante. O ibuprofeno não encapsulado foi determinado utilizando um espectrofotómetro UV-VIS (JASCO V-650, Japão) a um comprimento de onda de 272 nm. A eficácia de encapsulação (EE) e a capacidade de carga (LC) do ibuprofeno dos NLC foi determinada usando as seguintes equações [271]:

$$EE(\%) = \frac{\text{Quantidade total de ibuprofeno} - \text{Quantidade de ibuprofeno livre}}{\text{Quantidade total de ibuprofeno}}$$

Eq.(1)

$$LC(\%) = \frac{\text{Quantidade total de ibuprofeno} - \text{Quantidade de ibuprofeno livre}}{\text{Quantidade total lipídica}}$$

Eq.(2)

#### 2.3.4.4.1 Doseamento do fármaco por espectrofotometria UV-VIS

Para que se possa quantificar a eficácia de encapsulação e a capacidade de carga dos NLC foi utilizado como método de doseamento a espectrofotometria UV-VIS. Para tal foi utilizado o espectrofotómetro UV-VIS JASCO V-650 (Japão). Com vista a dosear o ibuprofeno encapsulado, as leituras de absorvência foram realizadas a 272 nm. Este método analítico teve de ser previamente validado para poder gerar resultados fiáveis e seguros.



**Figura 19.** Espectrofotômetro UV-VIS JASCO V-650 (Japão).

A espectrofotometria UV-VIS é uma técnica analítica utilizada para determinar a quantidade de um determinado analito numa determinada amostra [5]. O espectrofotômetro mede a radiação absorvida ou transmitida por uma determinada solução que contém um determinado analito [5]. Desta forma, quando se faz incidir um determinado feixe de luz de um comprimento de onda específico sobre uma determinada amostra, o analito que se pretende quantificar, absorve uma determinada quantidade de radiação [5]. A quantidade de radiação absorvida a esse comprimento de onda é proporcional à quantidade de analito presente nessa solução. A lei de Lambert-Beer (Equação 3) é utilizada para determinar a concentração de um determinado analito existente numa determinada amostra:

$$A = -\log_{10} \left( \frac{I}{I_0} \right) = \epsilon \cdot C \cdot L$$

Eq.(3)

Legenda da equação: A – Absorvência medida,  $I_0$  – intensidade da luz incidente a um determinado comprimento de onda; I – Intensidade transmitida pela amostra; L – distância percorrida pela luz na amostra;  $\epsilon$  – constante designada absortividade molar (específica de cada substância); C – concentração da substância em mol/L [362].

A validação de um determinado método analítico assegura que este método é exato, específico, preciso, reprodutível e robusto, na gama de concentrações em que o analito é analisado [5,363]. As especificações para a validação dos métodos analíticos foram harmonizadas pela ICH através da norma “Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1)” (ICH Q2 (R1) [363]. Esta norma apresenta os parâmetros exigidos para validar um determinado método, partindo-se do princípio que para cada método analítico, existe um conjunto de parâmetros a validar [363]. Na Tabela VII

encontram-se especificados os parâmetros que é necessário avaliar na validação de um método analítico para dosear um determinado analito presente numa amostra.

**Tabela VII.** Parâmetros necessários na validação de um método analítico (adaptado de ICH Q2 (R1) [363]).

Características	Identificação	Impurezas		Doseamento
		Quantificação	Limite	
Exatidão	-	+	-	+
Precisão				
Repetibilidade	-	+	-	+
Precisão Intermédia	-	+ (1)	-	+ (1)
Especificidade (2)	+	+	+	+
Limite de Detecção	-	- (3)	+	-
Limite de Quantificação	-	+	-	-
Linearidade	-	+	-	+
Amplitude	-	+	-	+

- Característica geralmente não avaliada;

+ Característica geralmente avaliada;

(1) Nos casos em que a reprodutibilidade é realizada, a precisão intermédia não é necessária;

(2) A falta de especificidade de um método pode ser compensada por outros procedimentos analíticos;

(3) Pode ser necessário em alguns casos;

#### 2.3.4.4.1.1 Exatidão

A exatidão é um parâmetro da validação que avalia a aproximação dos resultados analíticos obtidos relativamente a um valor dito de referência [363]. Desta forma, foram preparadas 6 soluções padrão de fármaco em solução padrão fosfato pH 7,4 nas seguintes percentagens: 120%, 100%, 80%, 60%, 40% e 20%. Após a preparação das soluções padrão procedeu-se à leitura das respetivas absorvências, sendo a exatidão avaliada pela percentagem de recuperação do analito na amostra. A exatidão do método (E) foi calculada através da seguinte equação:

$$E = [\sum_{i=1}^n [(\frac{Li}{Ti}) \times 100]]/n]$$

Eq.(4)

Legenda da equação: Li – valores de absorvência lidos; Ti- valores teóricos; n – número de padrões utilizados.

#### 2.3.4.4.1.2 Precisão

A precisão de um determinado método analítico é medida pela aproximação entre si de  $n$  medidas sucessivas [363]. O estudo da precisão de um método analítico pressupõe a análise de três propriedades, nomeadamente, a repetibilidade, a precisão intermédia e a reprodutibilidade. Estas três propriedades descrevem-se da seguinte forma [363]:

- repetibilidade – avaliar a precisão obtida nas mesmas condições operatórias, efetuando no mínimo 9 determinações, 3 concentrações e 3 réplicas ou então 6 determinações a 100% da concentração teste;
- precisão intermédia – avaliar as variações obtidas na sequência de determinações efetuadas por analistas diferentes, com equipamento diferente e em diferentes dias, realizados no mesmo laboratório;
- reprodutibilidade - avaliar a concordância entre valores interlaboratoriais efetuados com recurso a diferentes analistas e a equipamentos diferentes;

Para avaliar a precisão deste método procedeu-se unicamente ao estudo da repetibilidade, ou seja, 6 determinações do valor de absorvência da solução padrão de ibuprofeno em solução padrão fosfato pH 7,4 com uma concentração de 100%.

#### 2.3.4.4.1.3 Especificidade

Neste parâmetro avalia-se se o método responde somente ao analito alvo de estudo na presença de outros componentes, como excipientes, impurezas, produtos de degradação, entre outros, ou se existem interferências que incrementam o valor de absorvência lido [363]. Desta forma, procedeu-se à leitura da absorvência a 272 nm na fase aquosa das dispersões coloidais sem fármaco (NLC<sub>P</sub>), tendo esta sido obtida de acordo com o descrito no subcapítulo 2.3.4.4. Se estas soluções apresentarem absorvência a 272 nm, conclui-se que método não apresenta especificidade para o doseamento do ibuprofeno. É possível utilizar este método de uma forma fiável para o

doseamento do ibuprofeno, desde que sejam subtraídos os valores das absorvências dos excipientes.

#### 2.3.4.4.1.4 Linearidade

O método deve proporcionar uma correlação linear entre os valores de absorvência lidos e a concentração de analito presente na amostra [363]. Desta forma foram preparadas 6 soluções padrão de ibuprofeno em solução padrão fosfato pH 7,4 nas seguintes concentrações: 120%, 100%, 80%, 60%, 40% e 20%, procedendo-se à leitura das respectivas absorvências a um determinado comprimento de onda. Desta forma, calcula-se uma reta de calibração a partir de uma representação gráfica entre os valores de absorvência em função das diferentes concentrações das soluções padrão, tendo que se obter um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) > 0,999, [364].

#### 2.3.4.4.1.5 Amplitude

Este parâmetro reflete o intervalo entre a maior e a menor concentração de analito na amostra para o qual se demonstrou que a técnica analítica apresenta níveis adequados de precisão, exatidão e linearidade [363]. Desta forma, a amplitude do método a validar foi avaliada no intervalo entre 0 e 120% da concentração máxima prevista do analito.

#### 2.3.4.5 Avaliação da estabilidade ótica das dispersões coloidais (Turbiscan LAB Expert®)

A estabilidade ótica das dispersões coloidais foi efetuada com recurso ao Turbiscan LAB Expert® (Formulacion, França).



**Figura 20.** Turbiscan LAB Expert<sup>®</sup> (França) usado para a avaliar a estabilidade ótica das dispersões coloidais.

Esta técnica é uma excelente ferramenta que permite de forma fácil determinar a estabilidade física das dispersões coloidais, uma vez que deteta fenómenos de desestabilização, sem recorrer à diluição da amostra [281].

O Turbiscan LAB Expert<sup>®</sup> encontra-se equipado com uma luz de infravermelho ( $\lambda = 880 \text{ nm}$ ) e com dois detetores, um que deteta a luz retrodifundida ou refletida (BS) e outro que deteta a luz transmitida (T). Assim, o detetor T deteta a luz que passa através da amostra (ângulo de deteção do sinal T –  $0^\circ$ ) e o detetor BS deteta a luz difundida pela amostra para trás (ângulo de deteção do sinal BS –  $135^\circ$ ) [27,276,281]. Desta forma, estes dois detetores detetam flutuações no volume e tamanho das partículas como resultado de fenómenos de migração ou agregação [276]. A migração de partículas é causada por fenómenos reversíveis, nomeadamente, a sedimentação ou a formação de creme, enquanto a variação no tamanho das partículas é causada por fenómenos irreversíveis, incluindo a coalescência e a separação [276,281].

Nos ensaios efetuados aos NLC só é possível efetuar a leitura do sinal de BS, uma vez que, o sinal T é zero, uma vez que este tipo de dispersões coloidais são completamente opacas, não permitindo que a luz atravesse a amostra [319]. Assim, se os perfis de BS apresentam variações inferiores a  $\pm 10\%$ , considera-se que as dispersões coloidais são fisicamente estáveis, mas se as variações são superiores a  $\pm 10\%$  significa que estamos na presença de dispersões coloidais fisicamente instáveis [27,276,281,365,366]. As amostras analisadas foram colocadas numa célula de vidro cilíndrica sem qualquer tipo de diluição. As determinações foram efetuadas em diferentes dias após a sua preparação (0, 7, 15, 30 dias) em duas amostras do mesmo lote de



produção, armazenadas a duas temperaturas distintas, a 4°C (amostras armazenadas no frigorífico durante o tempo de estudo) e a 25°C (amostras colocadas à temperatura ambiente). A cada tempo de ensaio, as medições foram realizadas por um período de 10 minutos e calculada a média. O software denominado Turbisoft software version 2.1.0.52 (Formulaction, França), foi usado para o tratamento dos dados.

#### 2.3.4.6 Avaliação da estabilidade das dispersões de NLC ao longo do tempo de armazenamento

Com o objetivo de avaliar a estabilidade das nanopartículas lipídicas (NLC) procedeu-se à repetição da determinação das propriedades físico-químicas (Z-ave, PI e ZP) 90 dias após a sua preparação, através da técnica de DLS. Durante este período as amostras estiveram armazenadas no frigorífico a 4°C.

#### 2.3.4.7 Avaliação da estabilidade das dispersões de NLC na presença de fluido lacrimal artificial e na presença de fluido lacrimal artificial com mucina ou lisozima

A estabilidade das dispersões coloidais com e sem polímeros sensíveis a estímulos na presença de fluido lacrimal artificial (STF) na proporção de 40:7 (formulação:STF) foram avaliadas através da determinação das propriedades físico-químicas (Z-ave, PI e ZP) das nanopartículas, tendo estas sido determinadas recorrendo à técnica de DLS ao fim de 8 e 90 dias após a sua preparação.

Por outro lado, foi determinada a estabilidade das dispersões coloidais com e sem polímeros sensíveis a estímulos na presença de fluido lacrimal artificial com mucina e lisozima. A mucina e a lisozima são dois dos maiores componentes (glicoproteínas) existentes nos tecidos oculares [243,297]. Desta forma, as nanopartículas lipídicas foram misturadas e incubadas com a solução de mucina ou de lisozima em fluido lacrimal artificial pH 7,4 baseado no método desenvolvido por de Campos *et al.* (2004) [243] com as introduções introduzidas por Silva *et al.* (2013) [297]. As amostras foram misturadas com a solução de mucina 0,4 mg/mL em fluido lacrimal artificial pH 7,4 e com a solução de lisozima 1,0 mg/mL em fluido lacrimal artificial pH 7,4, tendo sido colocadas sob agitação constante a 34°C durante 2 horas. Para avaliar a interferências da mucina e da lisozima, as amostras foram também misturadas e incubadas nas mesmas condições somente com fluido lacrimal pH 7,4, funcionando como branco. Decorrido o tempo de

incubação, os valores de Z-ave, PI e ZP das diferentes amostras foram determinados por DLS como descrito anteriormente [243,297,367].

#### 2.3.4.8 Determinação do pH

A determinação do pH das diferentes preparações farmacêuticas foi efetuada com o recurso a um potenciômetro equipado com um eletrodo combinado de vidro Crison® Basic 20 (Espanha). Antes de cada utilização, procedeu-se à calibração do equipamento recorrendo a soluções padrão com os valores de 4,01, 7,00 e 9,21 (Crison®, Espanha). Os valores de pH das formulações de aplicação cutânea ou na mucosa ocular devem ser o mais próximo possível do pH fisiológico de forma a não causarem qualquer tipo de irritação ou desconforto após a sua administração. No entanto, está descrito na bibliografia que a utilização de formulações oftálmicas com valores de pH entre 4-8,5 não promove qualquer tipo de lesão, lacrimejar ou sensação de desconforto [52,278,356-358]. Os valores de pH devem também promover a estabilidade das formulações.

#### 2.3.4.9 Determinação da osmolalidade

A verificação da osmolalidade de uma formulação oftálmica é um parâmetro que se deve ter em conta quando estamos perante o desenvolvimento de uma forma farmacêutica deste tipo. Assim, garantir a isotonia (290-310 mOsm/kg) de uma formulação oftálmica é fundamental de modo a evitar irritação ou dano dos tecidos oculares [66,356,357]. A osmolalidade das formulações oftálmicas foi determinada usando o Micro-Osmometer Automatic Type 15 (Löser Messtechnik, Alemanha) usando alíquotas de 100 µL.



**Figura 21.** Osmómetro Micro-Osmometer Automatic Type 15 (Alemanha).

Este equipamento mede a osmolalidade através do abaixamento do ponto de congelamento da solução aquosa, ou seja, mede a diminuição do ponto de congelamento de uma solução abaixo do ponto do solvente puro, sendo esta diminuição dependente do número de moléculas de soluto nele dissolvido. O ponto de congelamento da amostra é definido como sendo a temperatura a que o estado sólido e líquido coexistem em equilíbrio [366]. É necessário realçar que existe uma correlação linear entre a osmolalidade e o ponto de congelamento. A título de exemplo, uma amostra de água pura congela a 0°C, apresentando uma osmolaridade de 0 Osmol/L, sendo que uma solução aquosa com uma osmolaridade de 1 Osmol/L de água congela a -1,858°C. Com recurso a esta técnica, a amostra é arrefecida a uma temperatura abaixo da temperatura de congelamento esperado da amostra, sendo determinada a temperatura a que o estado sólido e líquido coexistem em equilíbrio.

Embora, geralmente, seja possível com esta técnica proceder à determinação direta da osmolalidade de uma forma farmacêutica preparada com nanopartículas lipídicas, o mesmo já não é possível se a essa dispersão coloidal for adicionado um agente viscosificante, um polímero mucoadesivo ou um polímero sensível a um determinado estímulo. O aumento da viscosidade da formulação impede o congelamento da amostra, sendo impossível a leitura direta da osmolalidade. Desta forma, procedeu-se à diluição de 1:10 da formulação com água purificada, sendo depois realizada a medição da osmolalidade. Para que tal fosse possível, demonstrou-se que o valor da osmolalidade de uma formulação de NaCl 0,9% quando diluída na razão de 1:2, 1:5 e 1:10 apresentava uma correlação linear entre a osmolalidade e a diluição da amostra em água purificada. Com o objetivo de tornar as formulações oftálmicas isotónicas foi adicionada uma quantidade apropriada de agente isotonzante. Durante os estudos foram testados os

seguintes agentes isotonzantes: cloreto de sódio, glicerina, D-manitol, solução de sorbitol a 70% e propilenoglicol.

#### 2.3.4.10 Determinação da temperatura de transição de fase solução-gel

De forma a aumentar a biodisponibilidade das formulações oftálmicas para administração tópica, as formulações que possuem polímeros sensíveis a estímulos, devem sofrer uma transição de fase sol-gel imediatamente após entrarem em contacto com a temperatura da superfície ocular, ou seja, 34-35°C [15,39,40]. A otimização da concentração de polímero termossensível utilizado deve ser efetuada tendo em conta que a formulação oftálmica, após a sua administração, sofre uma diluição no fluido lacrimal existente na superfície ocular [39,40,344,368,369]. De acordo com a bibliografia e com o objetivo de simular o mais possível as condições fisiológicas *in vivo*, partiu-se dos seguintes pressupostos: a temperatura da superfície ocular situa-se entre os 34 e os 35°C; a quantidade média de formulação ocular aplicada no globo ocular é de 40 µL e o volume normal de fluido lacrimal na superfície ocular é de 7 µL [39,41].

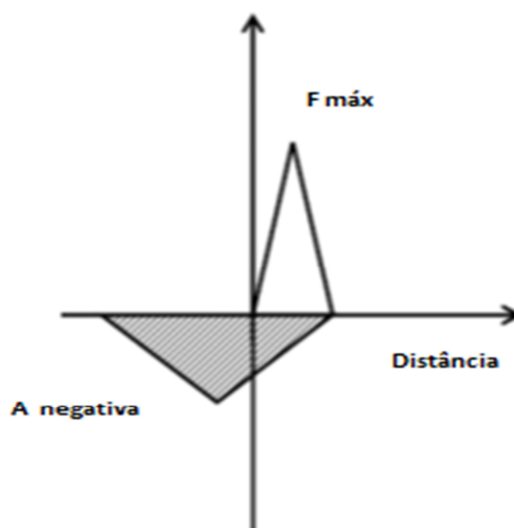
A avaliação da temperatura de transição sol-gel das formulações oftálmicas foi efetuada usando o método do tubo invertido [39,40,344,368,369]. Para a execução deste método foram usados tubos de ensaio com um diâmetro interno de 13 mm, sendo colocado no seu interior 10 g de amostra a ensaiar, com ou sem diluição em fluido lacrimal artificial. No caso da adição de fluido lacrimal artificial, esta fez-se na proporção de 40:7 (formulação: fluido lacrimal), dispersando o fluido lacrimal artificial sob agitação constante a 250 rpm durante 10 minutos. Os tubos de ensaio foram colocados em banho de água, sendo este aquecido a 60°C a um gradiente de 1°C/min. A temperatura de transição sol-gel atingida foi registada quando, colocando o tudo de ensaio a um ângulo de 90°, a formulação não se moveu ou fluiu [344,369].

#### 2.3.4.11 Análise dos parâmetros de textura

A análise dos parâmetros de textura de uma determinada forma farmacêutica semissólida permite o estudo das propriedades mecânicas, como sejam, a compressibilidade ou espalhamento, a adesividade e a firmeza. Salienta-se também o facto de a análise da textura das formas farmacêuticas ser um processo simples, versátil e eficiente. A firmeza de uma determinada preparação farmacêutica semissólida corresponde à força necessária para se atingir uma determinada deformação, sendo uma propriedade que está relacionada com a facilidade de remoção da formulação do

recipiente no qual se encontra acondicionada [177]. Por sua vez, a compressibilidade é o trabalho necessário para deformar a formulação durante a primeira passagem da sonda, sendo que a adesividade se traduz no trabalho necessário para superar as forças de atração entre a superfície da amostra e a superfície da sonda, ou seja, a adesividade é uma propriedade relacionada com a bioadesividade da formulação [177,370].

De acordo com a Figura 22, a firmeza representa a força máxima atingida, enquanto a adesividade traduz-se no cálculo da área negativa do gráfico força *versus* distância.



**Figura 22.** Representação de um gráfico força *versus* distância.

As formas farmacêuticas semissólidas devem sair com facilidade da embalagem, devem espalhar com facilidade na pele e devem possuir propriedades bioadesivas de forma a prolongar o tempo de retenção no local onde são aplicadas [186].

A análise da textura foi efetuada usando o texturómetro Stable Micro Systems TA-XT2i (Reino Unido) com uma célula de carga de 5 kg. A sonda cilíndrica (13 mm para as formulações para aplicação cutânea ou 25 mm para as formulações para aplicação oftálmica) foi forçada a penetrar na amostra a uma velocidade de 3 mm/s, até uma profundidade de 5 mm.



**Figura 23.** Texturómetro Stable Micro Systems TA-XT2i (Reino Unido).

No caso das formulações de aplicação cutânea os ensaios foram realizados a duas temperaturas,  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Neste tipo de formulações, e para avaliar o efeito do armazenamento a  $37^{\circ}\text{C}$ , os ensaios foram realizados 8 dias após a preparação das diferentes amostras e repetidos ao fim de 30 e 60 dias. Por outro lado, no caso das formulações oftálmicas, os ensaios foram realizados com e sem diluição em fluido lacrimal artificial na proporção de 40:7 a duas temperaturas  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Desta forma, foi avaliado o efeito da diluição da formulação em fluido lacrimal e o efeito da temperatura nos parâmetros de textura das formulações. As formulações (30 g de amostra num recipiente de 50 mL) foram colocadas na estufa às temperaturas indicadas nas 24 horas prévias ao ensaio.

#### 2.3.4.12 Análise reológica

A reologia pode ser definida como a ciência que estuda a deformação e o escoamento dos materiais, estudando desta forma a resposta destes quando lhes é aplicada uma determinada força ou tensão [177]. A viscosidade de um determinado material é a medida da resistência ao fluxo ou movimento, podendo ser também definida como a medida do atrito ou fricção interna de um fluido [225,371]. Desta forma, facilmente se depreende que um fluido com uma elevada viscosidade apresenta uma grande resistência ao fluxo, sendo menor a velocidade com que o fluido se movimenta [225].

Num escoamento de um determinado fluido, as camadas escoam a diferentes velocidades [225,371]. A relação entre a tensão de corte e o gradiente de velocidades pode ser obtida considerando duas placas do fluido a uma distância  $y$ , separadas por uma substância homogênea. Desta forma, Isaac Newton definiu a viscosidade de acordo com o seguinte modelo: se temos dois planos paralelos de fluido de igual área ( $A$ ), separados por uma distância ( $dx$ ) e que se movem na mesma direção a diferentes velocidades ( $V_1$  e  $V_2$ ), a força requerida para manter esta diferença de velocidades é proporcional à diferença de velocidades através do fluido, ou seja, ao gradiente de velocidade [225]. Esta definição pode ser expressa pelo seguinte modelo matemático (Equação 5):

$$\frac{F}{A} = \eta \frac{dv}{dx}$$

Eq.(5)

O gradiente de velocidade ( $dv/dx$ ), conhecido como velocidade de corte ( $D$ ), é a medida da velocidade à qual as camadas intermédias se movem umas em relação às outras (unidades -  $s^{-1}$ ). A tensão de corte ( $F/A$ ) traduz-se na força por unidade de área requerida para produzir uma ação de corte (unidades –  $N/m^2$ ). A viscosidade ( $\eta$ ) define-se como a força tangencial por unidade de área (conhecida como tensão de corte expressa em Pa) requerida para mover paralelamente uma camada de um líquido de um metro quadrado a uma velocidade de um metro por segundo sobre uma camada paralela a uma distância de um metro (unidades Pa.s) [3]. Esta definição pode ser expressa pelo seguinte modelo matemático (Equação 6):

$$\eta = \frac{\tau}{\gamma}$$

Eq.(6)

Os reogramas expressam as propriedades de escoamento de fluidos, relacionando a tensão de corte ( $\tau$ ) com a velocidade de corte ( $\gamma$ ). O comportamento reológico dos materiais pode ser dividido em dois tipos:

- elástico - o material retorna à sua forma original após remoção da força externa que lhe estava a ser aplicada;
- viscoso ou comportamento plástico - o material não recupera a sua forma original quando a força externa é removida [225];

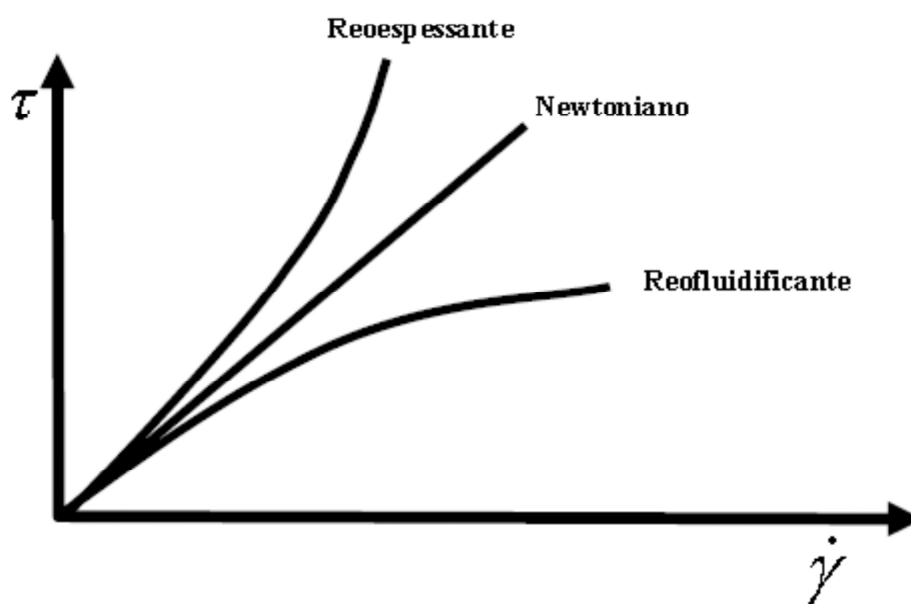
Nos fluidos com comportamento Newtoniano, a viscosidade é constante, independentemente da força aplicada, mas dependente da temperatura, da pressão e da composição do fluido [372]. No entanto, a maioria das formas farmacêuticas apresentam um comportamento não-Newtoniano [225]. Estes fluidos não apresentam uma

viscosidade constante, ou seja, este comportamento é caracterizado pela alteração da viscosidade com o aumento da tensão de corte aplicada [372]. Existem diferentes tipos de fluidos não-Newtonianos, os independentes do tempo e os dependentes do tempo. Os fluidos não-Newtonianos independentes do tempo podem ser de três tipos como ilustra a Figura 24:

- plásticos: os materiais viscoplásticos comportam-se como um corpo rígido a baixas tensões, não fluindo quando sujeitos a uma baixa tensão de corte, mas fluem como um fluido viscoso quando lhes é aplicada uma elevada tensão de corte (exemplos: alguns cremes);

- pseudoplásticos (reofluidificantes): a viscosidade diminui com o aumento da tensão de corte (exemplos: emulsões, dispersões e suspensões);

- dilatantes (reoespessantes): a viscosidade aparente aumenta com o aumento da tensão de corte, sendo que estes materiais comportam-se como um fluido, escoando a baixas tensões de corte, podendo-se tornar rígidos (parecendo um corpo sólido) quando submetidos a tensões de corte elevadas (exemplos: algumas pastas e formulações com elevada concentração de pigmentos) [373].



**Figura 24.** Reograma exemplificando alguns comportamentos reológicos dos fluidos não-Newtonianos (adaptado de Oliveira, 2009 [374]).

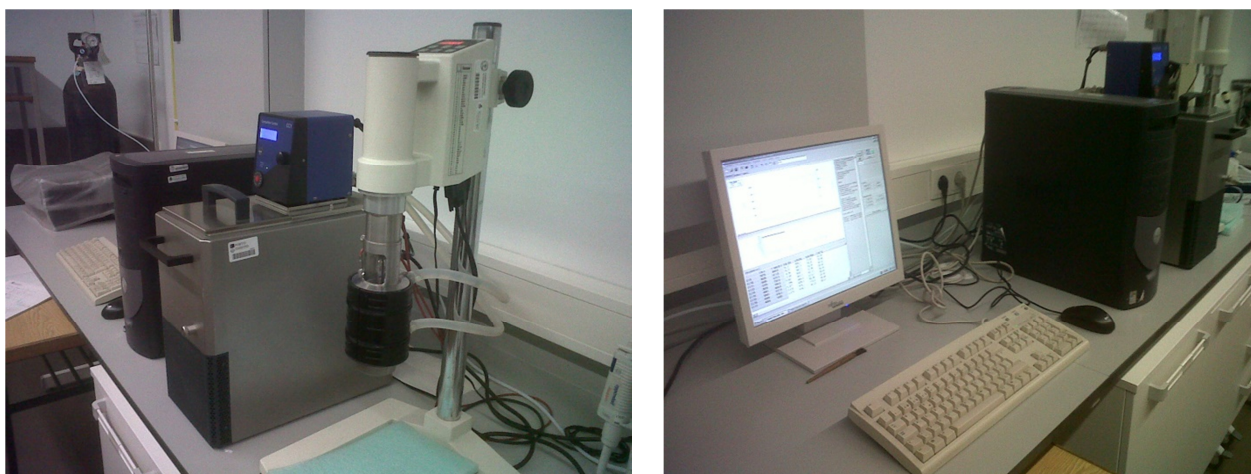
Por outro lado, os fluidos não-Newtonianos dependentes do tempo apresentam mudanças na viscosidade em função do tempo (sob condições constantes de tensão de corte) podendo ser de dois tipos:



- tixotrópicos: diminuição da viscosidade do fluido com o tempo de tensão de corte, a uma velocidade/taxa de tensão constante (tendencialmente mais estáveis, pois dificilmente os constituintes da preparação farmacêutica se separam ao longo do período de armazenamento);

- anti-tixotrópicos (tixotropia negativa): a viscosidade do fluido aumenta com o tempo da tensão de corte [373].

Os ensaios de viscosidade das diferentes preparações farmacêuticas foram realizados utilizando um viscosímetro rotativo Thermo Haake VT-550 tipo Searle (Alemanha) equipado com cilindros concêntricos (sensor de cilindro coaxial), onde a amostra é colocada entre o cilindro externo e o cilindro interno, verificando-se o movimento do cilindro interno quando o ensaio começa.



**Figura 25.** Viscosímetro rotacional Thermo Haake VT-550 tipo Searle (Alemanha).

De salientar que este equipamento permite efetuar os ensaios a diferentes temperaturas uma vez que possui um banho de água termostatado acoplado, com uma precisão de  $0,5^{\circ}\text{C}$ , permitindo manter a amostra a uma determinada temperatura durante todo o tempo de ensaio. A análise reológica iniciou-se com um tempo de estabilização de 1800 s, seguido de uma variação da velocidade de corte de 1 a  $500\text{ s}^{-1}$  (curva ascendente) e de 500 para  $1\text{ s}^{-1}$  (curva descendente).

No caso das formulações para aplicação cutânea, os ensaios foram efetuados a duas temperaturas ( $35$  e  $30 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ), de forma a avaliar o efeito da temperatura. Neste tipo de formulações, e para avaliar o efeito do armazenamento a  $37^{\circ}\text{C}$ , os ensaios foram realizados 8 dias após a preparação das diferentes amostras e repetidos ao fim de 30 e 60 dias.

No caso das formulações oftálmicas os ensaios foram efetuados a  $35\pm0,5^{\circ}\text{C}$  (temperatura da superfície ocular) e a  $25\pm0,5^{\circ}\text{C}$  (temperatura ambiente) com ou sem diluição da formulação oftálmica em fluido lacrimal artificial na proporção de 40:7.

#### 2.3.4.13 Estudos de mucoadesão na presença de fluido lacrimal artificial com mucina

Os estudos de mucoadesão das formulações oftálmicas preparadas com nanopartículas lipídicas e polímeros sensíveis a estímulos (quitosano e PF 127), foram executados recorrendo a dois métodos, nomeadamente, através da determinação da viscosidade e através da determinação da força e do trabalho de adesão. Como foi referido anteriormente, o quitosano apresenta propriedades mucoadesivas, uma vez que este polímero estabelece pontes de hidrogénio e interações eletrostáticas entre os seus grupos amina com carga positiva e as cargas negativas dos resíduos de ácido siálico da mucina [11,21,29,242-244,249]. Espera-se que o estabelecimento destas interações quitosano-mucina levará a alterações na viscosidade e no trabalho de adesão das formulações oftálmicas que contenham este polímero.

##### 2.3.4.13.1 Análise reológica das formulações diluídas em fluido lacrimal artificial contendo mucina

As diferentes formulações oftálmicas foram dispersas em fluido lacrimal artificial pH 7,4, previamente preparado com 8 e 15% (m/m) de mucina [92,138,221,375]. Primeiramente, a mucina de porco tipo II a diferentes concentrações foi dispersa sob agitação constante em fluido lacrimal artificial pH 7,4, sendo que após a solubilização da mucina, as amostras foram armazenadas no frigorífico a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas [92,138,221,375]. Em seguida, as diferentes formulações oftálmicas foram dispersas em soluções contendo 8% e 15% (m/m) de mucina em fluido lacrimal artificial, na proporção de 40:7, procedendo-se às análises reológicas a uma temperatura de  $35\pm0,5^{\circ}\text{C}$  de forma a simular as condições fisiológicas. Os ensaios de viscosidade das diferentes preparações foram realizados num viscosímetro rotativo de cilindros concêntricos Thermo Haake VT-550 tipo Searle (Alemanha). A análise reológica iniciou-se com um tempo de estabilização de 1800 s, seguindo de uma variação na velocidade de corte de 1 a  $500\text{ s}^{-1}$  (curva ascendente) e de 500 para  $1\text{ s}^{-1}$  (curva descendente).

#### 2.3.4.13.2 Determinação da força e do trabalho de adesão

A determinação da força de mucoadesividade expressa sob a forma de trabalho de adesão foi determinada de acordo com os trabalhos experimentais de Sandri *et al.* (2006) [92], Nep e Conway (2011) [376] e Nho *et al.* (2014) [377]. Para executar estas determinações foi utilizado o texturómetro Stable Micro Systems TA-XT2i (Reino Unido) equipado com um dispositivo específico designado equipamento de mucoadesão A/MUC (Figura 26).



**Figura 26.** Texturómetro TA-XT2i Texture Analyzer, equipamento com um dispositivo para avaliar a mucoadesão A/MUC.

O texturómetro estava equipado com uma célula de carga de 5 kg e com uma sonda cilíndrica com um diâmetro de 10 mm. A solução de mucina a 8% (m/m) em fluido lacrimal artificial e cada uma das amostras a ensaiar foram colocadas numa estufa a 36°C durante 24 horas. Este passo teve como objetivo assegurar que os ensaios eram executados a  $34\pm 2^\circ\text{C}$ , ou seja, de forma a simular as condições fisiológicas. Assim, 100  $\mu\text{L}$  de solução de mucina a 8% (m/m) em fluido lacrimal artificial a uma temperatura de  $34\pm 2^\circ\text{C}$  foi colocado num papel de filtro que foi inicialmente fixado no equipamento de mucoadesão A/MUC [92]. Por sua vez, na sonda cilíndrica foi colocado um adesivo de dupla face onde foi colocado um papel de filtro de 10 mm de diâmetro, tendo sido colocado 100 mg de cada uma das formulações oftálmicas a uma temperatura de  $34\pm 2^\circ\text{C}$  [92]. O ensaio iniciou-se com a sonda cilíndrica a baixar a uma velocidade de teste de 0,5 mm/s, entrando em contacto com o equipamento de mucoadesão que possui a solução de mucina em fluido lacrimal artificial, exercendo uma força de pré-carga de 0,5 N

durante 60 segundos [92,376-379]. Decorrido este tempo, a sonda subiu, destacando-se da amostra a uma velocidade pós-teste de 0,5 mm/s [376,379].

De forma a avaliar o efeito do aumento da concentração da mucina na força de mucoadesividade, foram repetidos os ensaios com uma solução de mucina a 15% (m/m) em fluido lacrimal artificial. O trabalho de adesão foi calculado diretamente pelo software do equipamento, denominado Texture Exponent, correspondendo à área por baixo da curva (AUC) da força requerida para destacar a formulação da solução de mucina em STF *versus* distância da curva [36,92,378,379].

#### 2.3.4.14 Estudos de biocompatibilidade: Ensaio de redução do Alamar Blue

Os ensaios de biocompatibilidade foram efetuados com recurso à linha celular do retinoblastoma humano Y-79 (CLS Cell Lines Service GmbH, Alemanha). As células Y-79 foram cultivadas em frascos de 75 cm<sup>2</sup> utilizando como meio de cultura o RPMI 1640 com GlutaMAX<sup>TM</sup>, suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) inativado pelo calor e antibiótico (100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina). As células foram mantidas numa incubadora com uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar, a uma temperatura de 37°C, tendo o meio de cultura sido mudado de dois em dois dias. Para o ensaio de citotoxicidade, as células foram centrifugadas e ressuspensas em meio de cultura celular. Depois deste passo, e depois de diluição apropriada, as células foram contadas e semeadas em placas de 96 poços, de forma a obter 25000 células por poço. Após um período de tempo de 24 horas, as células foram expostas às formulações oftálmicas alvo de teste, em concentrações que variaram entre 0 e 100,0 µg/mL no caso das formulações farmacêuticas desenvolvidas nos capítulos 4 e 5 e em concentrações entre 0 e 1000,0 µg/mL nas formulações farmacêuticas desenvolvidas no capítulo 6.

O tempo de exposição das formulações oftálmicas a testar com as células Y-79 foi de 24, 48 e 72 horas. A cada tempo de exposição pré-determinado, foi avaliada a viabilidade celular através do ensaio da redução do reagente Alamar Blue, tendo o ensaio sido efetuado de acordo com as instruções do fabricante do reagente. Resumidamente, as placas de 96 poços foram centrifugadas (300 x g, 3 minutos), sendo o meio de cultura celular contendo as formulações a testar removido. De seguida, o reagente Alamar Blue foi adicionado a cada poço numa concentração de 10% (v/v) em meio de cultura celular fresco e as células foram novamente incubadas nas condições anteriormente referidas (incubadora com uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar, a uma temperatura de 37°C), por um período de tempo de 4 horas, devidamente protegidas da luz. Decorrido o

tempo de incubação, a fluorescência foi avaliada utilizando um leitor de microplacas de fluorescência (BioTek Instruments, Vermont, USA) nos comprimentos de onda de excitação e emissão, 530/25 nm e 590/35 nm, respetivamente.

A medição da citotoxicidade foi avaliada através da percentagem de redução do reagente Alamar Blue relativamente às células de controlo que não contactaram com as formulações teste. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  DP, feitos a partir de 4 experiências independentes, cada uma das quais foi elaborada em triplicado. Todos os cálculos estatísticos foram efetuados com o software “GraphPad Prism 6.00 for Windows” (GraphPad Software, San Diego, California, USA). As comparações estatísticas foram efetuadas recorrendo ao Two-way ANOVA, seguido do *Bonferroni's multiple comparisons post hoc test* (capítulo 4 e 5) ou seguido do *Tukey's multiple comparisons post hoc test* (capítulo 6). Em todos os casos, valores de  $p < 0,05$  foram considerados diferenças significativas.

#### 2.3.4.15 Ensaio *in vitro* da irritabilidade ocular: HET-CAM

O método da membrana corioalantóide de ovo de galinha embrionado (HET-CAM) foi desenvolvido com o intuito de avaliar o potencial de irritação ocular de produtos farmacêuticos de aplicação tópica. Este ensaio é uma alternativa válida aos ensaios *in vivo* (*Draize eye irritation test*) que utilizam animais, especialmente coelhos [344,380-384]. O teste HET-CAM baseia-se na observação da membrana corioalantónica (CAM) de ovos fecundados de galinha Leghorn após exposição da formulação oftálmica durante um determinado intervalo de tempo [383]. A CAM é uma membrana muito similar aos tecidos vascularizados existentes no olho do humano [383]. Este ensaio foi realizado de acordo com o método descrito pela Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) (NIH Publication No. 10-7553, 2010) [385].

Para a realização deste ensaio foram utilizados ovos brancos recém-fecundados (menos de um dia) de galinha Leghorn (Leghorn Shaver Starcross 288, Granja Santa Isabel, Espanha; peso médio de 50-60 g). Os ovos foram incubados durante 9 dias a uma temperatura de  $37,8 \pm 0,3^\circ\text{C}$  e a uma humidade de  $58 \pm 2\%$ . Nos primeiros 8 dias, os ovos foram sujeitos a uma rotação contínua através de um sistema automático de rotação de forma a prevenir a ligação do embrião a um dos lados do ovo. Após este período de tempo, todos os ovos foram analisados cuidadosamente por transiluminação, tendo que se verificar a existência da formação do embrião. Os ovos não viáveis, ou seja, em que não se verificou o desenvolvimento do embrião, foram descartados. Prosseguiu-se a

incubação dos ovos embrionados por mais um dia, nas condições acima referidas, à exceção da rotação. Os ovos foram imobilizados de forma a permitir a estabilização da membrana corioalantônica.

Depois de decorrido o tempo de incubação (9 dias), e de forma muito cuidadosa para não danificar os vasos sanguíneos existentes na membrana CAM, foi removida a casca e a membrana interna, tendo este passo o objetivo de expor a CAM [344,383]. Seguidamente, 300 µL da formulação oftálmica alvo de teste foi colocado em contacto com a CAM. O produto foi testado à temperatura de armazenamento (4°C) e à temperatura corporal (37°C). A validação do ensaio foi assegurada com a aplicação sobre a CAM, nas mesmas condições e quantidades, de controlos positivos (solução aquosa de laurilsulfato de sódio SDS a 1% e solução aquosa de NaOH a 0,1 N) e de um controlo negativo (solução aquosa de NaCl a 0,9%).

Lise, hemorragia e/ou coagulação são alterações macroscópicas que podem ocorrer e que podem ser facilmente observadas nos vasos sanguíneos existentes na CAM, como principais efeitos adversos após exposição a uma determinada substância teste. Os efeitos da exposição das diferentes formulações e respetivos controlos foram analisados após 30 segundos, 2 minutos e 5 minutos de exposição e sujeitos a uma pontuação atribuída usando as recomendações da ICCVAM [385]. Desta forma, de acordo com o tipo de lesão observada e o tempo a que cada uma destas lesões surgiu, foi atribuída uma pontuação de acordo com a Tabela VIII. A pontuação final da irritabilidade ocular da substância a testar resulta do somatório das pontuações atribuídas por tipo de lesão.

Assim, e de acordo com este sistema de classificação, a pontuação máxima de irritabilidade ocular é de 21, sendo que se considera que a formulação é “não irritante” se a pontuação final for inferior a 9, sendo considerada “irritante severa” se a pontuação final for superior a 9. De forma a considerar o resultado válido, o controlo negativo tem que induzir uma resposta de “não irritante”, ou seja, uma pontuação final de 0, e os controlos positivos têm que induzir uma resposta de “irritante severo” em que a pontuação final terá de ser de 10 para a solução aquosa de SDS 1% e de 19 para a solução aquosa de NaOH a 0,1 N.

Os ensaios foram realizados em triplicado (n=3), tanto para a substância alvo de teste, como para os controlos positivo e negativo, sendo os resultados apresentados como o somatório das pontuações obtidas das médias das pontuações parciais de cada lesão.

**Tabela VIII.** Pontuações a atribuir nos tempos definidos.

Efeito	Pontuação a atribuir		
	0,5 min	2 min	5 min
Lise	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação	9	7	5

#### 2.3.4.16 Ensaios de libertação/dissolução *in vitro*

Os ensaios de libertação/dissolução *in vitro* são um dos ensaios utilizados para avaliar o desempenho e qualidade das formas farmacêuticas, ajudando a detetar possíveis problemas nas matérias-primas, na formulação ou no processo de fabrico. Este tipo de ensaios é também utilizado nos estudos de pré-formulação, aquando do desenvolvimento galénico, permitindo melhorar o desempenho e a biodisponibilidade da forma farmacêutica [9]. Em formas de libertação modificada, os ensaios de dissolução assumem um papel fundamental, permitindo avaliar a velocidade de dissolução do fármaco ao longo do tempo de ensaio e fazer comparações entre perfis de dissolução de distintas formas farmacêuticas, ajudando a tirar conclusões muito úteis [2,5].

Para perceber com clareza o perfil de dissolução de uma substância sólida num determinado meio de dissolução líquido e as variáveis que o podem influenciar, utiliza-se a equação de NOYES-WHITNEY modificada (Equação 7).

$$\frac{dC}{dt} = AS(C_s - C)$$

Eq. (7)

Legenda da equação:  $dC/dt$  corresponde à velocidade de dissolução;  $A$  é uma constante que depende da agitação do solvente, do volume de líquido e do coeficiente de difusão do fármaco a dissolver;  $S$  é a área do sólido;  $C_s$  é a sua concentração na zona de difusão que rodeia a parte não dissolvida;  $C$  é a concentração da substância no solvente e  $t$  é o tempo [5]. Conclui-se da leitura da equação que a velocidade de dissolução pode sofrer alterações significativas se se proceder a alterações na velocidade de agitação, na natureza, no pH e no volume do meio de dissolução [5].

#### 2.3.4.16.1 Formulações para aplicação cutânea

Os ensaios de libertação/dissolução das formulações de aplicação cutânea foram realizados utilizando aparelho de dissolução SOTAX AT7 (Suíça).



**Figura 27.** Aparelho para realização do ensaio de dissolução SOTAX AT7 (Suíça).

Os ensaios de dissolução foram efetuados em triplicado colocando 1 g de cada hidrogel num vidro de relógio no fundo de cada recipiente de dissolução. O líquido de dissolução (500 mL de solução tampão fosfato pH 7,4 preparado de acordo com a Farmacopeia Portuguesa 9.0 [3]), sob agitação constante a 100 rpm e mantido a  $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Em intervalos específicos (5, 30, 60, 90 e 120 minutos), 5 mL de amostra foram retirados de cada vaso de dissolução, sendo a quantidade de fármaco libertado avaliada em triplicado num espectrofotómetro UV-VIS (JASCO V-650, Japão) (a 272 nm para os hidrogéis de poloxâmero com ibuprofeno e a 258 nm para os hidrogéis de poloxâmero com hidrocortisona) usando a solução tampão fosfato pH 7,4 como branco.

#### 2.3.4.16.2 Formulações para aplicação oftálmica

No caso das formulações de aplicação oftálmica, o ensaio de libertação do ibuprofeno a partir das dispersões coloidais foi efetuado colocando 10 g de cada uma das amostras em 50 mL de meio de dissolução sob agitação constante (150 rpm). Dependendo do ensaio, foram utilizados dois meios de dissolução distintos, a solução tampão fosfato pH 7,4 (preparada de acordo com a Farmacopeia Portuguesa 9.0 [3]) e o fluido lacrimal artificial pH 7,4 (preparado com 6,8 g de NaCl, 2,2 g de  $\text{NaHCO}_3$ , 0,084 g



de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e 1,4 g de KCl em 1 litro de água ultrapura) [138]. As diferentes amostras foram colocadas em banho de água mantido a uma temperatura de  $35,0 \pm 1^\circ\text{C}$ , tendo os ensaios de dissolução sido efetuados em triplicado. Em intervalos de tempo pré-determinados (30, 60, 120, 240 e 360 minutos), procedeu-se à recolha de 2 mL de amostra de cada recipiente de dissolução, colocando a mesma num tubo de centrifugação com filtro.

O ibuprofeno não encapsulado e dissolvido no meio de dissolução foi separado da restante dispersão coloidal usando a técnica de filtração/centrifugação. Para tal, foram utilizados tubos de centrifugação com filtro Ultracel-50K (Amicon®, Millipore Corporation, Irlanda) com um tamanho de poro nominal de 50000 NMWL (limite nominal de peso molecular). Assim, as amostras recolhidas foram sujeitas a uma centrifugação de 3500 rpm durante 1 hora usando a centrífuga ThermoFisher Scientific Heraeus Multiuge X1R (Alemanha), tendo o ibuprofeno encapsulado ficado retido na membrana filtrante, enquanto o ibuprofeno livre e dissolvido no meio de dissolução passou através da membrana filtrante.

A quantidade de ibuprofeno libertado e dissolvido no meio de dissolução foi avaliada em triplicado num espectrofotómetro UV-VIS (JASCO V-650, Japão) a 272 nm. Para determinar o perfil de libertação do ibuprofeno ao longo do tempo de ensaio no meio de dissolução foram utilizadas as equações [358]:

$$Q_n = C_n \times V_0 + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \times V_i$$

Eq.(8)

$$Fn\% = \frac{Q_n}{C_0 \times V_0} \times 100\%$$

Eq.(9)

Legenda da equação:  $Q_n$  (mg/mL) – quantidade de ibuprofeno no meio de dissolução no tempo de ensaio  $n$ ;  $C_n$  – concentração de ibuprofeno no meio de dissolução no tempo de ensaio  $n$ ;  $V_0$  – volume de meio de dissolução a cada tempo de amostragem;  $C_i$  – concentração da amostra  $i$  no meio de dissolução;  $V_i$  – volume de recolha de amostra a cada tempo de amostragem [358].

Os ensaios de dissolução *in vitro* dos hidrogéis oftálmicos preparados com PF 127 15% e ibuprofeno (HG<sub>i</sub>-PF 127 15% (m/m)) foram efetuados da mesma forma, à exceção do passo da filtração, o qual não é necessário para este tipo de formulações. Aos mesmos intervalos de tempo, procedeu-se à recolha de 5 mL de amostra de cada recipiente de dissolução e o ibuprofeno libertado/dissolvido no meio de dissolução foi

avaliado em triplicado utilizando um espectrofotômetro UV-VIS (JASCO V-650, Japão) a 272 nm.

Por fim, e com o objetivo de comparar os diferentes perfis de liberação do fármaco a partir das diferentes formulações farmacêuticas desenvolvidas, foram calculados os factores de semelhança  $f_2$  através da seguinte equação:

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[ 1 + (1/n) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\}$$

Eq.(10)

Legenda da equação:  $R_t$  e  $T_t$  são as percentagens de fármaco dissolvido a cada tempo  $t$ , sendo  $n$  o número de recolhas.

Para a aplicação do cálculo dos factores de semelhança  $f_2$  os perfis de dissolução a comparar têm que ter sido efetuados nas mesmas condições de ensaio e esses perfis de dissolução devem ter pelo menos três tempos de dissolução [4]. Assim, obtêm-se valores de  $f_2$  entre 0 (perfis de dissolução muito diferentes) e 100 (perfis de dissolução sobreponíveis). Se os perfis de dissolução que estão a ser comparados apresentam valores de  $f_2$  entre 50 a 100 conclui-se que os perfis são semelhantes. Quando os valores de  $f_2$  apresentam valores próximos de zero conclui-se que os perfis de dissolução que estão a ser comparados são muito diferentes.

#### 2.3.4.16.3 Doseamento do fármaco por espectrofotometria UV-VIS

Para determinar a quantidade de fármaco dissolvido no meio de dissolução utilizado, a cada tempo de recolha, é necessário utilizar um método analítico adequado. Assim sendo, foi selecionado como método analítico a espectrofotometria UV-VIS, tendo sido utilizado o espectrofotômetro JASCO V-650 (Japão). Para assegurar que o método analítico utilizado gerava resultados fiáveis e seguros, procedeu-se à sua validação.

##### 2.3.4.16.3.1 Exatidão

Foram preparadas 6 soluções padrão de fármaco no meio de dissolução utilizado com as seguintes concentrações: 120%, 100%, 80%, 60%, 40% e 20%. Após a

preparação das soluções padrão procedeu-se à leitura das respectivas absorvências, sendo a exatidão avaliada pela percentagem de recuperação do analito na amostra.

#### 2.3.4.16.3.2 Precisão

Para avaliar a precisão do método de doseamento do fármaco procedeu-se ao estudo da repetibilidade, tendo sido efetuadas 6 determinações do valor de absorvência da solução padrão do fármaco no meio de dissolução utilizado, tendo sido avaliada a solução com a concentração de 100%.

#### 2.3.4.16.3.3 Especificidade

Neste parâmetro avalia-se se o método responde somente ao analito alvo de estudo na presença de outros componentes, como excipientes, impurezas, produtos de degradação, entre outros, ou se existem interferências que incrementam o valor de absorvência lido [363]. Desta forma, no caso dos hidrogéis preparados com os diferentes poloxâmeros, foram preparadas soluções contendo os hidrogéis somente com os excipientes em solução tampão fosfato pH 7,4 tendo sido lido o valor de absorvência a 272 nm. No caso das nanopartículas lipídicas procedeu-se à leitura da absorvência a 272 nm na fase aquosa das dispersões coloidais sem fármaco (NLC<sub>P</sub>), tendo esta sido obtida de acordo com o descrito no subcapítulo 2.3.4.16.2. Se estas soluções apresentarem absorvência a 272 nm, conclui-se que método não apresenta especificidade para o doseamento do ibuprofeno. É possível utilizar este método de uma forma fiável para o doseamento do ibuprofeno libertado e dissolvido no respectivo meio de dissolução, desde que sejam subtraídos os valores das absorvências dos excipientes.

#### 2.3.4.16.3.4 Linearidade

Foram preparadas 6 soluções padrão do fármaco no meio de dissolução selecionado, com as seguintes concentrações: 120%, 100%, 80%, 60%, 40% e 20%, procedendo-se à leitura das respectivas absorvências a um determinado comprimento de onda, dependendo este do fármaco a dosear. De seguida, determinou-se a reta de calibração a partir da representação gráfica entre os valores de absorvência em função das diferentes concentrações das soluções padrão.

#### 2.3.4.16.3.5 Amplitude

A amplitude de um método analítico que reflete o intervalo entre a maior e a menor concentração de analito na amostra para o qual se demonstrou que a técnica analítica apresenta níveis adequados de precisão, exatidão e linearidade [363]. Desta forma, a amplitude do método a validar foi avaliada no intervalo entre 0 e 120% da concentração máxima prevista do analito.

### **3. Influência da incorporação de fármacos, da temperatura e do tempo de armazenamento no pH, na textura, nas propriedades reológicas e no perfil de liberação do fármaco incorporado em diferentes hidrogéis preparados com poloxâmeros**

#### **3.1 Introdução**

A aplicação tópica de fármacos tem como objetivo primordial fazer chegar ao alvo terapêutico elevadas concentrações de fármaco evitando, desta forma, os efeitos adversos sistêmicos normalmente associados à sua administração oral [207]. Alguns polímeros (naturais, semissintéticos e sintéticos) quando em solução, a determinadas concentrações, formam hidrogéis, que na presença de determinados estímulos sofrem transições reversíveis sol-gel [19,80,186]. Os hidrogéis apresentam como vantagens o facto de serem facilmente aplicados e de aderirem à derme ou a outras mucosas [80]. Desta forma, este tipo de sistema farmacêutico, agrega não só, as propriedades coesivas dos sólidos, como também, as características de transporte por difusão dos líquidos [158,186]. A aplicação tópica de sistemas farmacêuticos compostos por polímeros sensíveis a estímulos, sob a forma de veículos hidrossolúveis de elevada viscosidade, apresenta variadíssimas vantagens, destacando-se, a acumulação e a permeação retardada do fármaco veiculado, promovendo uma liberação sustentada e prolongada do fármaco ao longo do tempo, quando comparadas com as formulações convencionais [124,158,162].

Nos últimos anos os Poloxâmeros têm suscitado muito interesse no desenvolvimento de sistemas farmacêuticos de aplicação dérmica e transdérmica. Os Poloxâmeros têm sido bastante utilizados no design de sistemas farmacêuticos dérmicos e transdérmico, com o objetivo de promover a acumulação da formulação na pele. Este tipo de formas farmacêuticas promovem, não só, um aumento do tempo de contacto da formulação com a pele, como também retarda a permeabilidade do fármaco veiculado (principalmente anti-inflamatórios e analgésicos) através da pele [134,146,203,204,212]. Desta forma, conseguem-se atingir elevadas concentrações de fármaco no alvo terapêutico, limitando a ocorrência de efeitos secundários [207].

Esta etapa do trabalho experimental teve como principal objetivo estudar a influência de diferentes parâmetros, tais como, a incorporação de diferentes fármacos (ibuprofeno e hidroclotisona), a temperatura e o tempo de armazenamento nos valores do pH, na textura, no comportamento reológico e no perfil de liberação dos fármacos

incorporados em hidrogéis preparados com diferentes tipos de poloxâmero (Lutrol® F-127 e Lutrol® F-108) em diferentes concentrações.

O ibuprofeno é um fármaco anti-inflamatório não esteroide, pertencendo ao subgrupo dos fármacos derivados do ácido propanóico, usado no tratamento de patologias inflamatórias crônicas, eventos anti-inflamatórios e analgésicos agudos [6]. Quando administrado por via oral, o ibuprofeno pode provocar efeitos secundários diversos, como sejam, dores de cabeça, dores de estômago, vômitos, diarreia e úlceras duodenais [386]. Desta forma, é imperativo utilizar uma via de administração alternativa, como a via tópica, com o objetivo primordial de potenciar o efeito terapêutico e minimizar os possíveis efeitos adversos [186]. Por outro lado, a hidrocortisona é um fármaco anti-inflamatório corticosteróide e imunossupressor, usado em formas farmacêuticas tópicas em concentrações entre 0,5–2,5% (m/m), sendo praticamente insolúvel na água e ligeiramente solúvel na acetona e no álcool [3,387]. Este fármaco é utilizado no tratamento de alergias e na artrite reumatoide [388]. A hidrocortisona apresenta variadíssimos efeitos adversos, entre os quais destacam-se, a fraqueza muscular, as alterações do ritmo cardíaco, o síndrome de Cushing, as miopatias, a hiperglicemia, a osteoporose, as alterações digestivas (flatulência, náuseas e diarreia), a agitação, as insónias, a diminuição da resistência a agentes infecciosos e as reações cutâneas diversas [388].

Assim, foram preparados hidrogéis de LF-127 e de LF-108, com uma concentração de polímero de 20% (m/m), tendo sido incorporado o ibuprofeno (5%, m/m) e a hidrocortisona (1%, m/m). Foram também preparados hidrogéis de LF-127 com uma concentração de polímero de 30% (m/m), contendo os fármacos acima referidos, nas mesmas concentrações. Este facto teve como propósito estudar a influência do aumento da concentração de poloxâmero nas diferentes propriedades dos hidrogéis (pH, textura, comportamento reológico e perfil de libertação dos fármacos incorporados), sendo que se efetuou esse estudo unicamente com o LF-127.

### 3.2 Materiais e Métodos

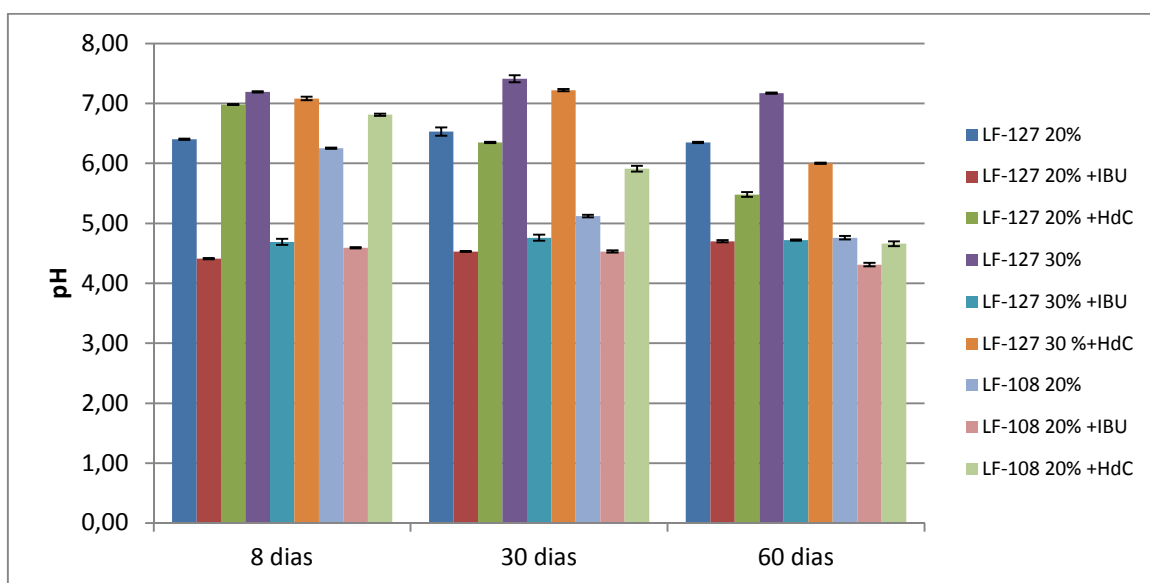
A lista de matérias-primas, reagentes e equipamento utilizados nos ensaios descritos neste capítulo está indicada no capítulo 2. De igual modo, os métodos utilizados neste capítulo (determinação do pH, análise dos parâmetros de textura, análise reológicas e ensaios de libertação/dissolução *in vitro*) foram realizados de acordo com as metodologias descritas no capítulo anterior.

### 3.3 Resultados e Discussão

Depois de preparados, e de forma a simular as condições fisiológicas, os diferentes hidrogéis foram armazenados numa estufa a 37°C durante todo o tempo do estudo. Os diferentes ensaios foram efetuados ao fim de 8, 30 e 60 dias após a preparação dos diferentes hidrogéis.

#### 3.3.1 Determinação do pH

Como é possível verificar na Figura 28, 8 dias após a preparação dos hidrogéis de LF-127 e LF-108 20% (m/m) sem qualquer tipo de fármaco, os valores de pH foram de  $6,40 \pm 0,01$  e  $6,25 \pm 0,01$ , respetivamente. Estes valores estão de acordo com a ficha técnica fornecida pelo fabricante BASF Corporation.



**Figura 28.** Valores de pH dos hidrogéis de LF127 e LF-108, durante o tempo de armazenamento de 8, 30 e 60 dias.

Depois de 60 dias de armazenamento a 37°C, o hidrogel de LF-127 20% (m/m) manteve um valor de pH constante durante o tempo de estudo, enquanto o hidrogel de LF-108 20% (m/m) baixou o seu valor de pH para  $4,76 \pm 0,03$ . Como já foi referido, o aumento da temperatura provoca a quebra das pontes de hidrogénio existentes entre a água e as cadeias hidrófilas dos poloxâmeros. Assim, o armazenamento dos hidrogéis a 37°C durante 60 dias provocou a evaporação lenta da água, levando à ocorrência de

alterações nos valores de pH dos hidrogéis. Estas alterações dependem do tipo de poloxâmero utilizado na preparação do hidrogel, isto porque, de acordo com a ficha técnica, o polímero LF-108 apresenta uma maior proporção hidrófila, enquanto o polímero LF127 apresenta uma maior proporção hidrófoba. Assim, verifica-se que nos hidrogéis preparados com o polímero LF-108, a quantidade de água evaporada é maior, aumentando assim a sensibilidade destas formulações à variação da temperatura, justificando desta forma a maior variação no valor do pH.

A adição de ibuprofeno numa percentagem de 5% (m/m) aos hidrogéis preparados com LF-127 ou com LF-108 20% (m/m) provocou uma diminuição significativa dos valores de pH. Este facto deve-se à natureza do fármaco incorporado, uma vez que o ibuprofeno é um derivado do ácido propanóico [6]. Assim, após 8 dias de armazenamento, o hidrogel de LF-127 20% (m/m) com ibuprofeno apresentou um valor de pH de  $4,41 \pm 0,01$ , enquanto o hidrogel de LF-108 20% (m/m) com ibuprofeno apresentou um valor de pH de  $4,59 \pm 0,01$ . Por outro lado, a adição de hidrocortisona (1%, m/m) promoveu um aumento dos valores do pH dos hidrogéis em que foi incorporado. Este comportamento era esperado, uma vez que, de acordo com a bibliografia consultada, uma solução aquosa de hidrocortisona de igual concentração, apresenta um valor de pH aproximado de 6,8 [389]. Assim, após 8 dias de armazenamento, o hidrogel de LF-127 20% (m/m) com hidrocortisona apresentou um valor de pH de  $6,98 \pm 0,01$ , enquanto o hidrogel de LF-108 20% (m/m) com hidrocortisona apresentou um valor de pH de  $6,81 \pm 0,02$ .

Após 60 dias de armazenamento, o hidrogel de LF-127 20% (m/m) com hidrocortisona apresentou uma diminuição no valor de pH para  $5,48 \pm 0,04$ , enquanto o hidrogel de LF-108 20% (m/m) com o mesmo fármaco apresentou uma diminuição para  $4,66 \pm 0,04$ . A hidrocortisona apresenta uma boa estabilidade a valores de pH entre 3,5 e 4,5, sendo que acima destes valores verifica-se um efeito catalítico do ião hidróxido que promove a decomposição da hidrocortisona [390]. Este efeito é visível no gráfico da Figura 28, verificando-se uma diminuição clara dos valores de pH nos hidrogéis preparados com hidrocortisona.

Foi também possível verificar que no caso dos hidrogéis preparados com o polímero LF-127 ou com o LF-108 20% (m/m) contendo ibuprofeno não se registaram variações consideráveis nos valores de pH ao longo do tempo de armazenamento. O aumento da concentração de polímero LF-127 de 20% para 30% (m/m) não provocou alterações relevantes nos valores de pH, independentemente do fármaco incorporado ou do tempo de armazenamento.



### 3.3.2 Análise dos parâmetros de textura

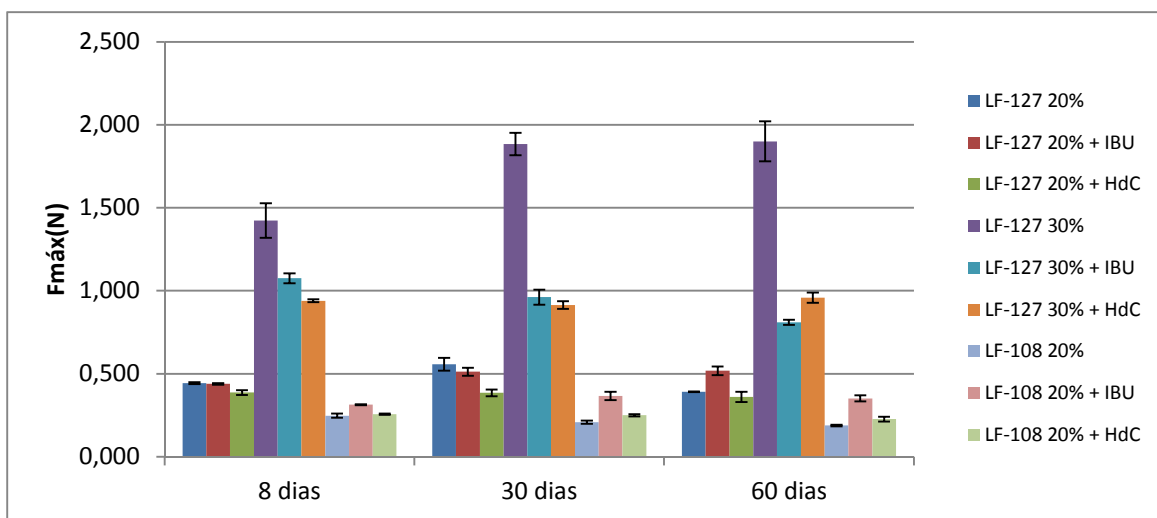
Os ensaios de textura foram realizados num texturómetro Stable Micro Systems TA-XT2i (Reino Unido) equipado com uma sonda cilíndrica de 13 mm.



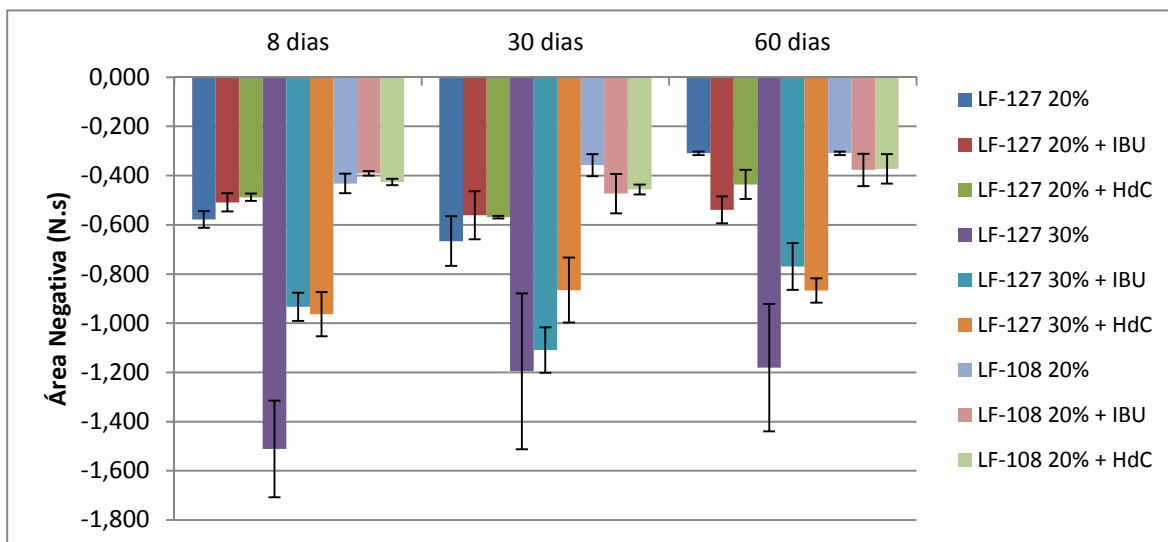
**Figura 29.** Ensaios de textura com a sonda cilíndrica de 13 mm.

Como se pode ver na Figura 30, depois de 8 dias de armazenamento a 37°C, os hidrogéis de LF-127 20% (m/m) apresentaram valores mais elevados de firmeza e de adesividade que os hidrogéis de LF-108 20% (m/m). Como era de esperar, o aumento da concentração de polímero LF-127 de 20 para 30% (m/m) provocou um aumento dos valores de firmeza e de adesividade.

(A)



(B)



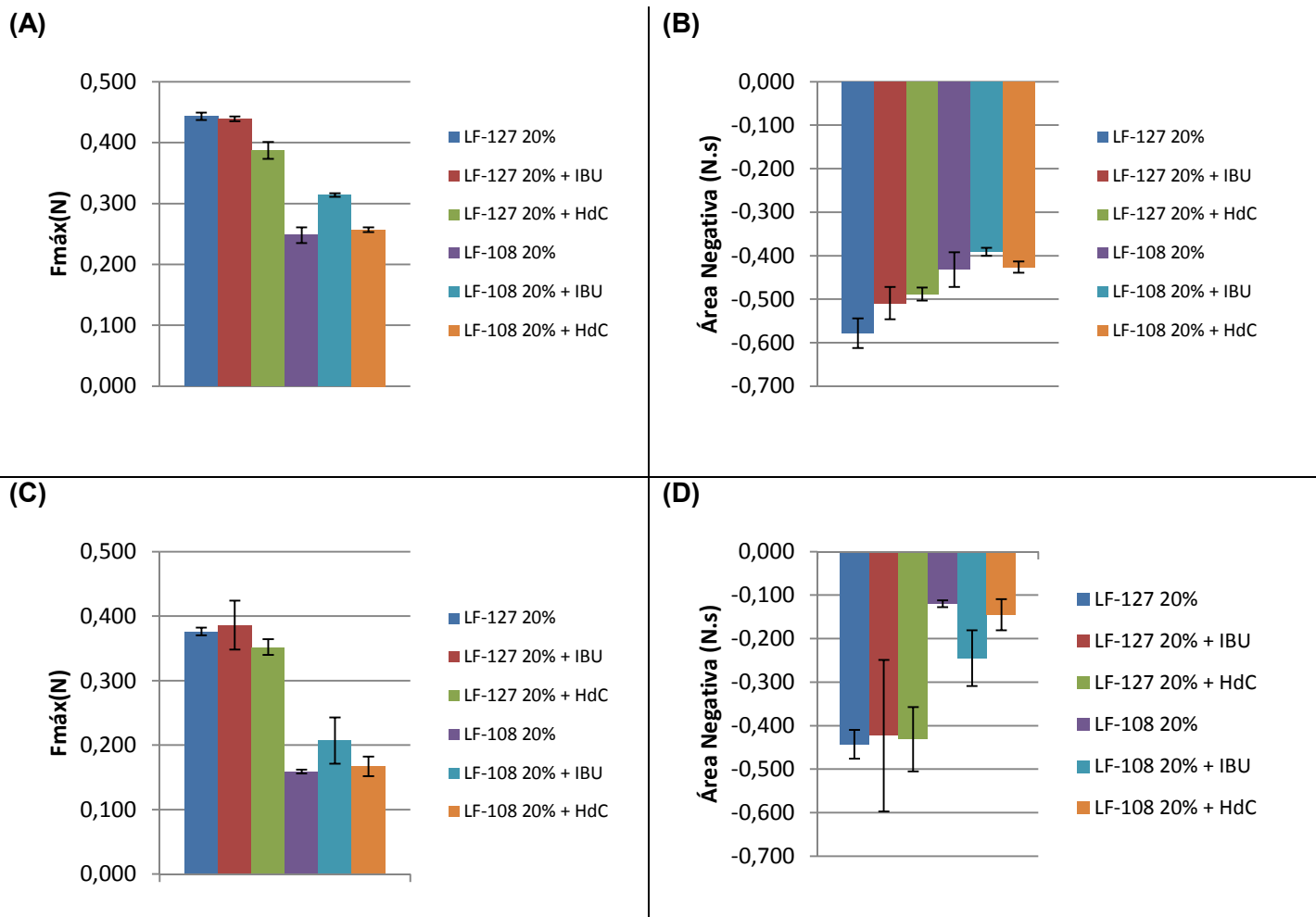
**Figura 30.** Firmeza ( $F_{máx}$ ) (A) e Adesividade (Área Negativa) (B) dos hidrogéis de LF-127 e LF-108 determinadas a uma temperatura de  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ , ao fim de 8, 30 e 60 dias de armazenamento.

Nas formulações preparadas com 20% (m/m) de polímero, após 60 dias de armazenamento, verificou-se uma ligeira diminuição dos valores da firmeza em ambos os hidrogéis sem fármaco. O mesmo já não se verificou no hidrogel de LF-127 preparado com 30% (m/m), verificando-se neste caso um aumento da firmeza ao longo do tempo de armazenamento. A adição de ibuprofeno aos hidrogéis preparados com os polímeros LF-127 e LF-108 20% (m/m) provocou o aumento da firmeza, enquanto a adesividade não demonstrou variações consideráveis decorridos os 60 dias de armazenamento. Nos hidrogéis de LF-127 e LF-108 20% (m/m) contendo hidrocortisona não se verificaram

variações relevantes na firmeza e na adesividade decorridos os 60 dias de armazenamento. Da mesma forma, vários investigadores demonstraram que a adição de alguns fármacos, sais, tensioativos, polímeros ou co-solventes provocam alterações na formação de micelas, promovendo alterações significativas na textura e na viscosidade de hidrogéis contendo poloxâmeros [107,180-183]. Contrariamente ao que foi constatado no nosso estudo, Sharma e Bhatia (2004) [183] adicionaram naproxeno e indometacina (fármacos hidrófobos) a hidrogéis de poloxâmero tendo registado uma diminuição do tamanho micelar, uma diminuição da agregação micelar e uma diminuição do número de micelas formadas, diminuindo por consequência a textura e a viscosidade dos hidrogéis.

Como seria de esperar, o aumento da concentração de polímero LF-127 de 20 para 30% (m/m) provocou o aumento da firmeza do hidrogel sem fármaco, verificando-se o aumento deste parâmetro ao longo do tempo de armazenamento. Da mesma forma, verificou-se o aumento da adesividade com o aumento da concentração do poloxâmero no hidrogel, no entanto, não se verificou uma alteração considerável da adesividade deste, decorridos os 60 dias de armazenamento. A adição tanto do ibuprofeno como da hidrocortisona ao hidrogel de LF-127 30% (m/m) provocou a diminuição da firmeza e da adesividade, não se verificando variações muito acentuadas na firmeza e na adesividade ao longo do tempo de armazenamento.

A natureza termossensível dos poloxâmeros faz com que os hidrogéis preparados com estes polímeros apresentem variações na textura (firmeza e adesividade) e no comportamento reológico quando sujeitos a temperaturas de ensaio distintas. Assim, de forma a comprovar a natureza termossensível destes hidrogéis, a firmeza e a adesividade a duas temperaturas distintas, ou seja a  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$  e a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ , foram comparadas. A Figura 31 ilustra os resultados da firmeza e da adesividade dos diferentes hidrogéis preparados com diferentes poloxâmeros, avaliados a  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$  e a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ .



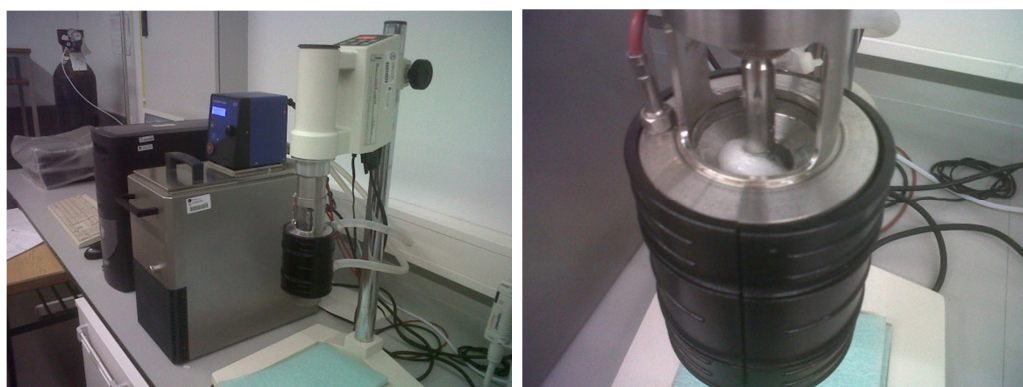
**Figura 31.** Comparação entre os valores de firmeza **(A)** e adesividade **(B)** dos hidrogéis de LF127 e LF-108 20% (m/m) avaliadas a 35±2°C com os valores de firmeza **(C)** e adesividade **(D)** dos hidrogéis de LF127 e LF-108 20% (m/m) avaliados a 30±2°C.

Como seria de esperar, os resultados obtidos demonstraram que uma ligeira diminuição da temperatura de ensaio de 35±2°C para 30±2°C, provocou uma diminuição significativa nos valores da firmeza e da adesividade de todas as formulações testadas. Lenaerts *et al.* (1987) [391] nos seus trabalhos experimentais estudaram a influência da concentração de poloxâmero e da temperatura de ensaio em hidrogéis de poloxâmero (PF 127) tendo concluído que o aumento da concentração ou da temperatura promoveu o aumento da viscosidade e consequentemente da textura. Constata-se que o aumento da temperatura provoca a dessolvatação gradual das cadeias hidrofílicas do polímero termossensível devido à rutura das pontes de hidrogénio que se estabelecem entre estas cadeias e o solvente (água), aumentando assim a agregação micelar [156,158,186]. Este fenómeno favorece as interações hidrofóbicas entre as cadeias de PPO, provocando a gelificação do hidrogel. Como já foi referido anteriormente, o processo de desidratação

que ocorre devido ao armazenamento prolongado a 37°C, torna os grupos hidroxilo mais acessíveis, sendo este fenômeno mais acentuado em hidrogéis preparados com poloxâmeros constituídos por uma maior proporção hidrofílica, ou seja, nos hidrogéis preparados com o polímero LF-108. Assim, este tipo de hidrogéis apresenta uma maior sensibilidade às variações de temperatura. Como o polímero LF-127 apresenta uma maior proporção hidrófoba, os hidrogéis preparados com este tipo de poloxâmero apresentam uma menor sensibilidade às variações da temperatura.

### 3.3.3 Análises reológicas

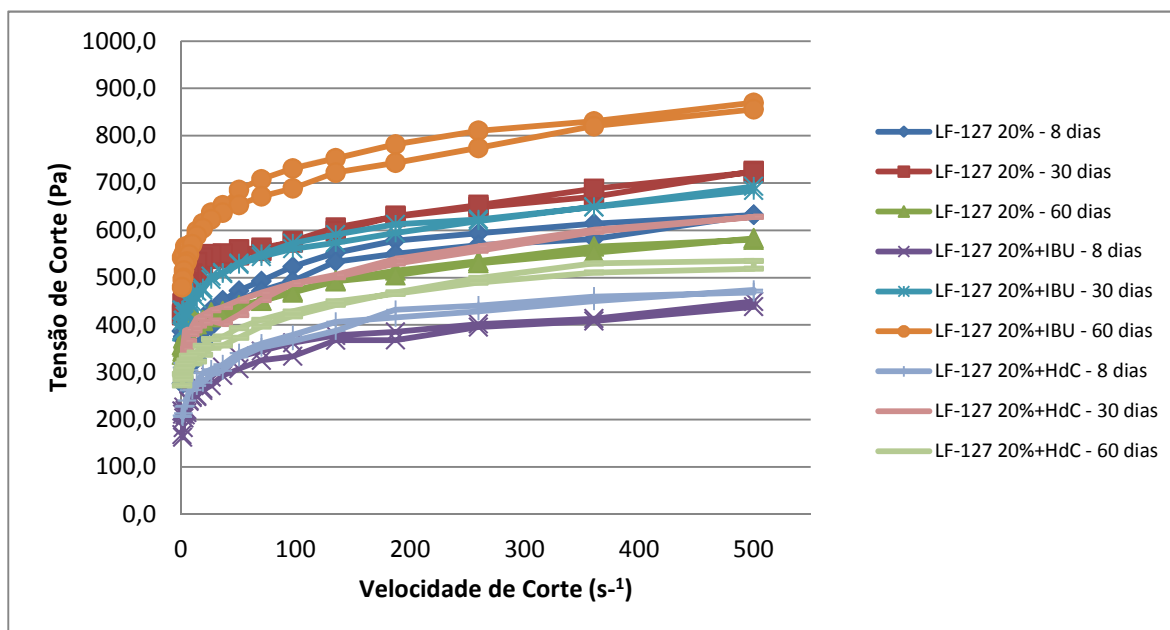
Os ensaios para a determinação da viscosidade foram realizados utilizando um viscosímetro rotativo de cilindros concêntricos Thermo Haake VT-550 (Alemanha).



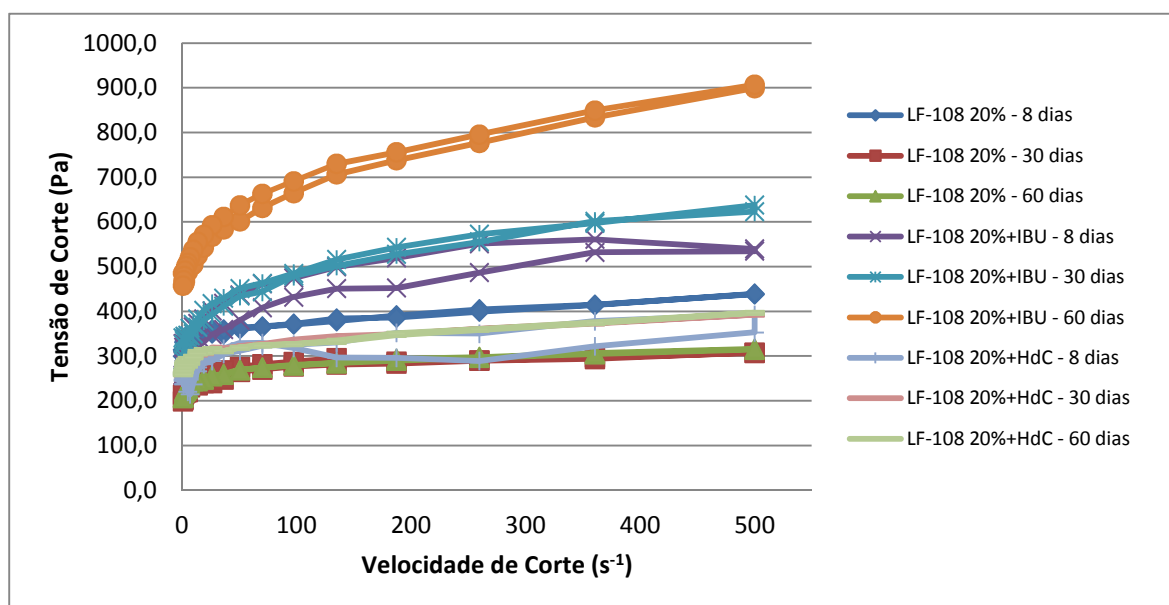
**Figura 32.** Pormenor do ensaio de viscosidade utilizando um viscosímetro rotativo de cilindros concêntricos Thermo Haake VT-550 (Alemanha).

Como é possível verificar na Figura 33, e tal como seria de esperar, os hidrogéis preparados com o polímero LF-108 apresentaram menor viscosidade que os hidrogéis preparados com o LF-127. A adição do ibuprofeno ou da hidroclotisona traduziu-se em alterações da viscosidade dos hidrogéis. Após 60 dias de armazenamento a 37°C, os hidrogéis de L-127 e LF-108 20% (m/m) com ibuprofeno apresentaram um aumento significativo na viscosidade. Este comportamento está de acordo com os resultados da firmeza.

(A)



(B)



**Figura 33.** Reogramas dos hidrogéis de LF-127 e LF-108 20% (m/m) contendo ibuprofeno ou hidroclotisona realizados a  $35\pm 0,5^{\circ}C$ , ao fim de 8, 30 e 60 dias de armazenamento.

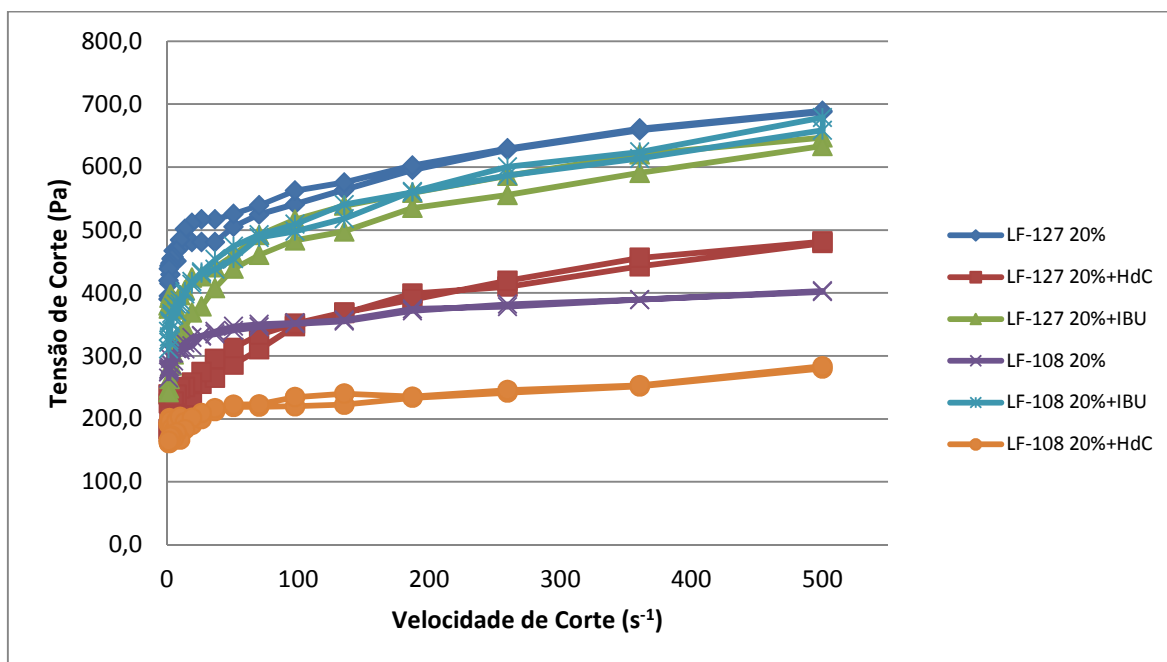
Já no caso dos hidrogéis preparados com LF-127 e LF-108 20% (m/m) com hidroclotisona não se verificaram grandes alterações na viscosidade destes hidrogéis ao

longo do tempo de armazenamento. Este facto justifica-se devido à pequena percentagem de hidrocortisona incorporada nestes hidrogéis (1%, m/m).

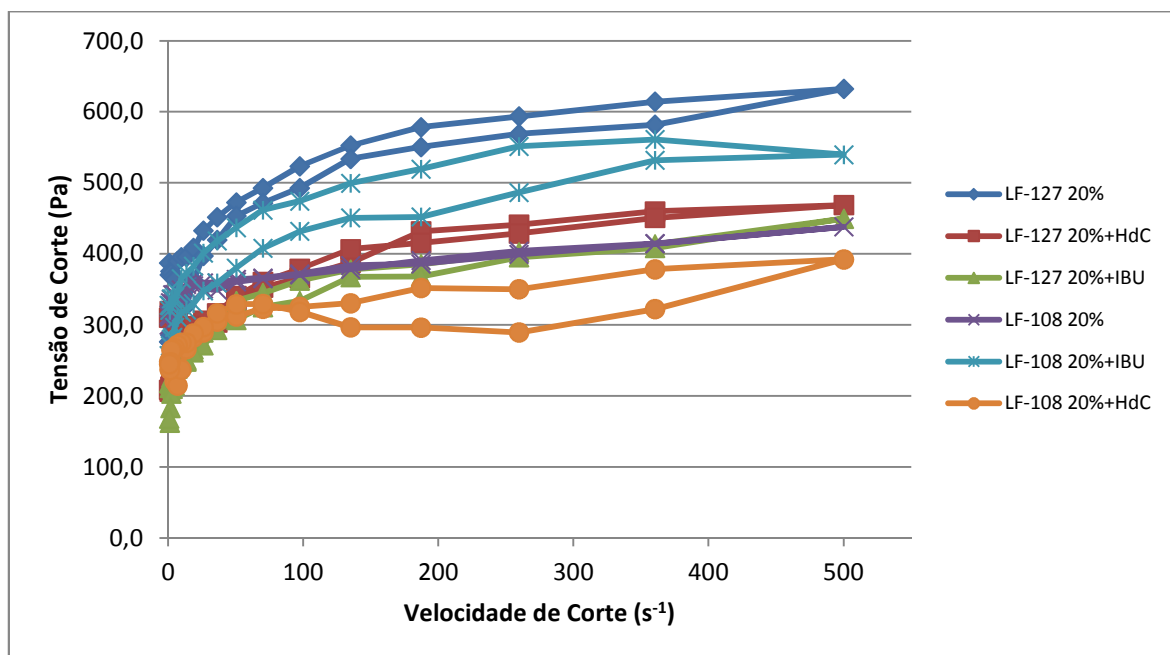
Como se pode ver nos diferentes reogramas, todas as preparações apresentaram um comportamento reofluidificante com um ligeiro valor de cedência e praticamente sem tixotropia, à exceção do hidrogel de LF-108 20% (m/m) contendo ibuprofeno, após 8 dias de armazenamento, o qual apresentou uma notória diminuição da tensão de corte com o tempo. É também possível verificar que a incorporação de ibuprofeno ou hidrocortisona nos hidrogéis de LF-127 e LF-108 20% (m/m) não afetou o comportamento reológico dos hidrogéis. Não obstante as nossas conclusões, os autores Sharma e Bhatia (2004) [183] concluíram nos seus estudos que a incorporação de fármacos anti-inflamatórios em preparações farmacêuticas contendo poloxâmeros causou alterações no seu comportamento reológico. Estes autores afirmaram que a adição deste tipo de fármacos provoca não só uma diminuição no tamanho micelar, como também uma diminuição dos fenómenos de agregação, levando a uma diminuição do número de micelas formadas. Pandit e Kisaka (1996) [180] concluíram também que a adição de fármacos a hidrogéis preparados com poloxâmeros não só causa alterações no comportamento reológico destes sistemas semissólidos como também provoca alterações na libertação dos fármacos neles incorporados.

De forma a avaliar a influência da variação da temperatura de ensaio no comportamento reológico dos diferentes hidrogéis, a viscosidade foi avaliada a duas temperaturas,  $30 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  e  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . A Figura 34 mostra os reogramas dos hidrogéis obtidos a duas temperaturas,  $30 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  e  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .

(A)



(B)



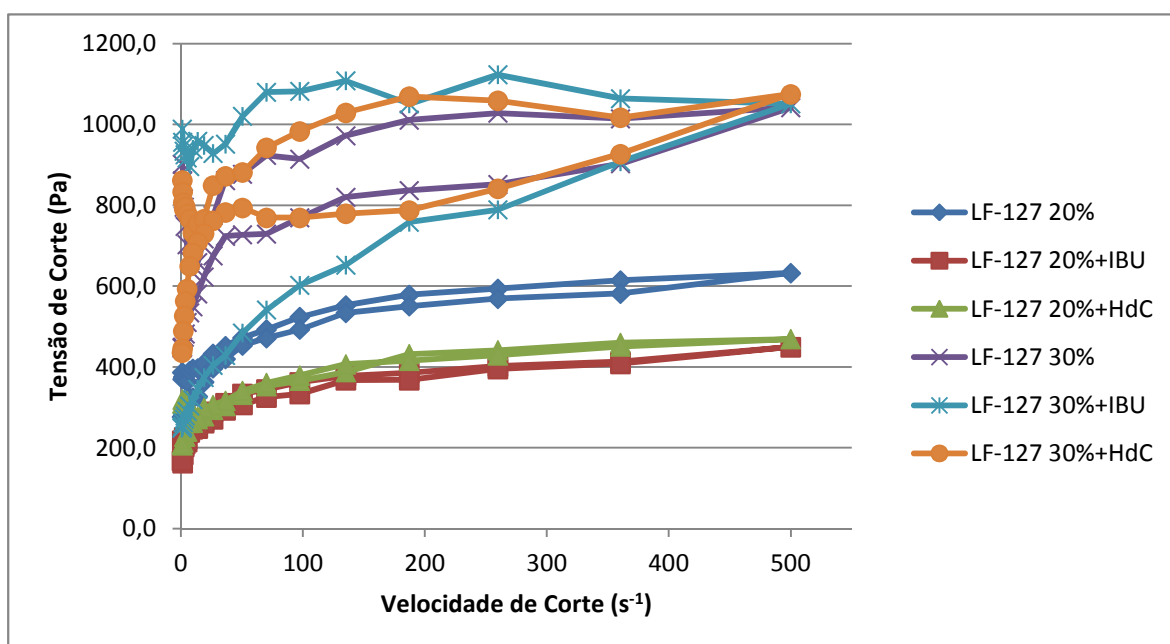
**Figura 34.** Comparação entre os reogramas dos hidrogéis LF-127 e LF-108 obtidos a  $30 \pm 0,5$  (A) e a  $35 \pm 0,5^\circ C$  (B).

Assim, à exceção do hidrogel LF-108+HdC, a diminuição da temperatura de ensaio para  $30 \pm 0,5^\circ C$  provocou uma ligeira diminuição da viscosidade dos hidrogéis preparados com LF-108 20% (m/m). Estes resultados estão de acordo com os resultados de firmeza e adesividade realizados com a mesma variação da temperatura. No caso dos



hidrogéis preparados com LF-127 20% (m/m), a diminuição da temperatura de ensaio de  $35\pm0,5^{\circ}\text{C}$  para  $30\pm0,5^{\circ}\text{C}$  não causou alterações significativas na viscosidade, denotando que os hidrogéis preparados com este polímero são mais estáveis às variações da temperatura. Este facto já foi explicado anteriormente, estando relacionado com as diferentes proporções entre as porções hidrófilas-hidrófobas apresentadas pelos diferentes poloxâmeros usados na preparação dos hidrogéis. A maior porção hidrófila existente no polímero LF-108 confere-lhe uma maior sensibilidade às variações da temperatura. De notar que, de um modo geral, a  $30\pm0,5^{\circ}\text{C}$  os hidrogéis apresentaram um comportamento reológico reofluidificante com ligeiro valor de cedência e sem tixotropia, à exceção do LF-108 20%+HdC e do LF-108 20%+IBU que apresentaram uma diminuição da tensão de corte com o tempo.

Como forma de avaliar a influência da concentração de polímero LF-127 no comportamento reológico dos diferentes hidrogéis, procedeu-se ao estudo deste parâmetro a uma temperatura de  $35\pm0,5^{\circ}\text{C}$  ao fim de 8 dias após a preparação.



**Figura 35.** Reogramas dos hidrogéis preparados com 20 e 30% (m/m) de LF-127 realizados a  $35\pm0,5^{\circ}\text{C}$  ao fim de 8 dias após a preparação.

Tal como sucedeu nos ensaios de textura, o aumento da concentração de poloxâmero de 20 para 30% (m/m) provocou um aumento da viscosidade dos diferentes hidrogéis. Como se pode verificar pela análise dos reogramas da Figura 35, os diferentes hidrogéis preparados com 30% (m/m) de LF-127 também apresentaram um comportamento reofluidificante com valor de cedência. No entanto, estes hidrogéis

apresentaram tixotropia, sendo a área de histerese maior no caso do hidrogel LF-127 30%. Além disso, os reogramas dos hidrogéis com 30% de polímero apresentaram um aspeto mais irregular devido à sua elevada viscosidade. Lenaerts *et al.* (1987) [391] utilizou nos seus estudos reológicos hidrogéis de PF 127 com concentrações que variavam entre os 15 e os 30% (m/m). Estes autores, nos seus estudos, analisaram o comportamento reológico dos diferentes hidrogéis preparados a diferentes temperaturas, ou seja, a 15 e a 35°C. Como seria de esperar, devido à natureza termossensível do polímero PF 127, os autores do estudo concluíram que existe uma relação exponencial entre a viscosidade e a temperatura, sendo esta relação dependente da concentração de poloxâmero utilizado. Edsman *et al.* (1998) [79] nos seus estudos demonstraram que o aumento da concentração de poloxâmero (de 18% até 25% (m/m)) num hidrogel oftálmico de aplicação tópica não só provocou um aumento da viscosidade do hidrogel como também provocou um aumento do tempo de residência no globo ocular. Da mesma forma, El-Kamel (2002) [71] preparou hidrogéis oftálmicos com concentrações crescentes de PF 127 veiculando o maleato de timolol. Da mesma forma, o aumento da concentração de PF 127 de 15 para 25% (m/m) provocou um aumento da viscosidade do hidrogel.

### 3.3.4 Ensaaios de libertação/dissolução *in vitro*

#### 3.3.4.1 Validação do método de doseamento do ibuprofeno

##### 3.3.4.1.1 Estudo da linearidade da resposta do detetor

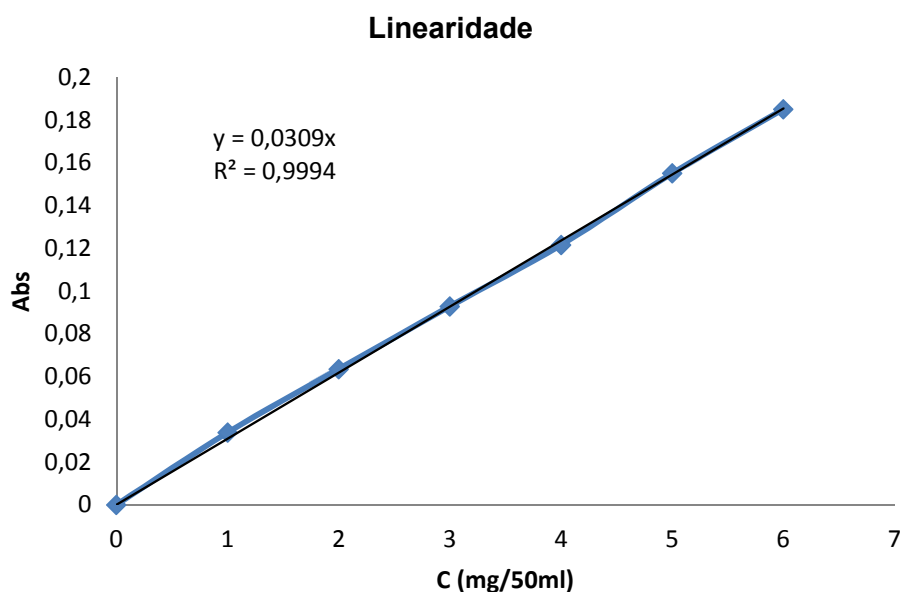
Antes de executar o ensaio de libertação/dissolução *in vitro* do ibuprofeno foi efetuada a validação do método analítico de doseamento. Desta forma, para efetuar o estudo da linearidade da resposta do detetor foram preparadas 6 soluções padrão de ibuprofeno em solução tampão fosfato pH 7,4 com as seguintes concentrações: 20% (1 mg/50 mL), 40% (2 mg/50 mL), 60% (3 mg/50 mL), 80% (4 mg/50 mL), 100% (5 mg/50 mL) e 120% (6 mg/50 mL).

Na Tabela IX apresentam-se os valores da absorvência obtidos para cada uma das soluções padrão preparadas.

**Tabela IX.** Valores das absorvências lidas para o estudo de linearidade da resposta do detetor do método analítico de doseamento espectrofotométrico do ibuprofeno.

C (%)	C (mg/50 mL)	Abs (272 nm)
0	0	0
20	1	0,0338
40	2	0,0635
60	3	0,0929
80	4	0,1216
100	5	0,1551
120	6	0,1851

A Figura 36 ilustra a representação gráfica dos valores das absorvências lidas em função das concentrações das soluções padrão de ibuprofeno.



**Figura 36.** Representação da reta de calibração relativa ao estudo da linearidade da resposta do detetor do método de doseamento espectrofotométrico do ibuprofeno.

A partir desta representação gráfica determinou-se o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), os valores da ordenada na origem e o declive da reta. O coeficiente de determinação foi de 0,9994, concluindo-se desta forma, que existe uma correlação linear entre as absorvências lidas e as diferentes concentrações das soluções padrão de ibuprofeno.

### 3.3.4.1.2 Estudo da precisão

Os estudos da precisão basearam-se na determinação da repetibilidade e, para isso, procedeu-se à leitura das absorvências de 6 amostras da solução padrão de ibuprofeno com uma concentração de 100%, ou seja, 5 mg/50mL. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela X.

**Tabela X.** Avaliação da repetibilidade do método de doseamento espectrofotométrico do ibuprofeno.

<b>Amostra</b>	<b>Valor de Abs lido</b>
1	0,1567
2	0,1565
3	0,1541
4	0,1548
5	0,1561
6	0,1564
<b>Média</b>	<b>0,1558</b>
<b>DP</b>	<b>0,0011</b>
<b>CV (%)</b>	<b>0,6814</b>

Os resultados da avaliação da repetibilidade apresentaram um desvio padrão de 0,0011 e um coeficiente de variação de 0,6814%. Como o coeficiente de variação (CV) é inferior a 2% concluiu-se que o método é preciso no que diz respeito à repetibilidade.

### 3.3.4.1.3 Estudo da exatidão

Na Tabela XI estão representados os resultados do estudo da exatidão.

**Tabela XI.** Avaliação da exatidão do método de doseamento espectrofotométrico do ibuprofeno.

<b>Conc. teórica (mg/50 mL)</b>	<b>Abs. Lida</b>	<b>Conc. Lida (mg/50 mL)</b>	<b>Recuperação de Ibuprofeno (%)</b>
1	0,0338	1,09	109,39
2	0,0635	2,06	102,75
3	0,0929	3,01	100,22
4	0,1216	3,94	98,38
5	0,1551	5,02	100,39
6	0,1851	5,99	99,84
<b>Média(%)</b>			<b>101,83</b>
<b>DP</b>			<b>3,96</b>
<b>CV (%)</b>			<b>3,89</b>

Os valores da recuperação de ibuprofeno são muito próximos de 100%, sendo assim podemos concluir que o método é exato.

#### 3.3.4.1.4 Especificidade

Verificou-se que os restantes excipientes da formulação apresentaram absorvência a 272 nm. Desta forma, concluiu-se que este método não cumpre o parâmetro da especificidade.

O método de doseamento espectrofotométrico do ibuprofeno cumpriu os requisitos da linearidade na gama de concentrações utilizadas, repetibilidade e exatidão. Dado que não cumpre o requisito da especificidade, é possível utilizar este método de uma forma fiável para o doseamento do ibuprofeno libertado a partir dos hidrogéis de poloxâmero e dissolvido na solução tampão fosfato pH 7,4, desde que sejam subtraídos os valores das absorvências dos excipientes que apresentam alguma absorvência no mesmo comprimento de onda.

#### 3.3.4.2 Validação do método de doseamento da hidro cortisona

##### 3.3.4.2.1 Estudo da linearidade da resposta do detetor

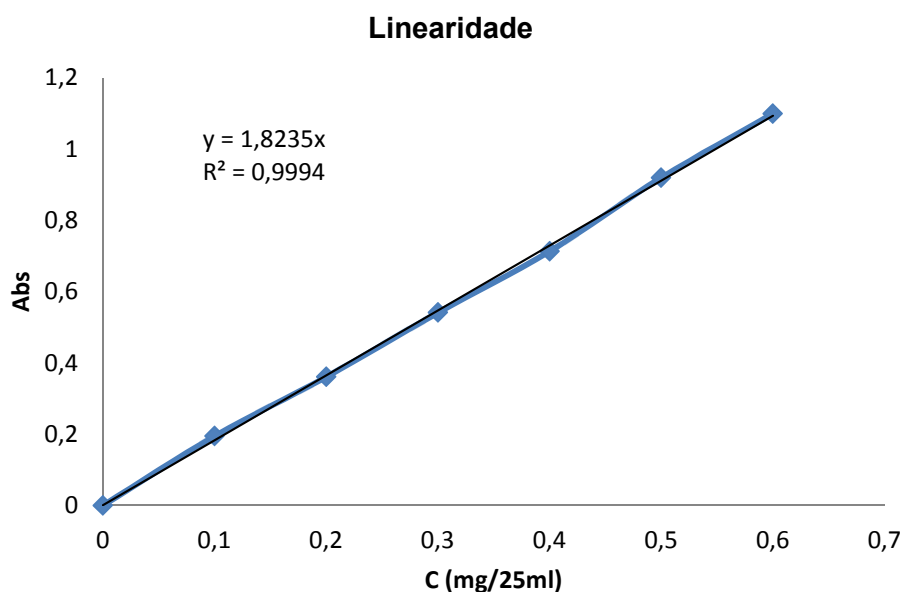
Antes de se proceder ao ensaio de libertação/dissolução *in vitro* da hidro cortisona foi efetuada a validação do método de doseamento. Da mesma forma, para efetuar o estudo da linearidade da resposta do detetor foram preparadas 6 soluções padrão de hidro cortisona em solução tampão fosfato pH 7,4 com as seguintes concentrações: 20% (0,1 mg/25 mL), 40% (0,2 mg/25 mL), 60% (0,3 mg/25 mL), 80% (0,4 mg/25 mL), 100% (0,5 mg/25 mL) e 120% (0,6 mg/25 mL).

Na Tabela XII apresentam-se os valores da absorvência obtidos para cada uma das concentrações padrão preparadas.

**Tabela XII.** Valores das absorvências lidas para o estudo de linearidade da resposta do detetor do método de doseamento espectrofotométrico da hidro cortisona.

C (%)	C (mg/25 mL)	Abs (258 nm)
0	0	0
20	0,1	0,1945
40	0,2	0,3608
60	0,3	0,5413
80	0,4	0,7134
100	0,5	0,9201
120	0,6	1,1000

A Figura 37 ilustra a representação gráfica dos valores das absorvências lidas em função das concentrações das soluções padrão de hidro cortisona.



**Figura 37.** Representação gráfica do estudo de linearidade da resposta do detetor do método de doseamento espectrofotométrico da hidro cortisona.

A partir desta representação gráfica determinou-se o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), os valores da ordenada na origem e o declive da reta. O coeficiente de determinação foi de 0,9994, concluindo-se desta forma, que existe uma correlação linear entre as absorvências lidas e as diferentes concentrações padrão de hidro cortisona.

#### 3.3.4.2.2 Estudo da precisão

Os estudos da precisão basearam-se na determinação da repetibilidade e, para isso, procedeu-se à leitura da absorvência de 6 amostras da solução padrão de hidrocortisona com uma concentração de 100%, ou seja, 0,5 mg/25 mL. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela XIII.

**Tabela XIII.** Avaliação da repetibilidade do método de doseamento espectrofotométrico da hidrocortisona.

<b>Amostra</b>	<b>Valor de Abs lido</b>
1	0,9201
2	0,9200
3	0,9210
4	0,9211
5	0,9207
6	0,9215
<b>Média</b>	<b>0,9207</b>
<b>DP</b>	<b>0,0006</b>
<b>CV (%)</b>	<b>0,0639</b>

Este método apresentou um desvio padrão de 0,0006 e um coeficiente de variação de 0,0639%. Como o coeficiente de variação é inferior a 2%, concluiu-se assim, que o método é preciso no que diz respeito à repetibilidade.

#### 3.3.4.2.3 Estudo da exatidão

Na Tabela XIV estão representados os resultados da avaliação da exatidão.

**Tabela XIV.** Avaliação da exatidão do método de doseamento espectrofotométrico da hidrocortisona.

Conc. teórica (mg/25 mL)	Abs. Lida	Conc. Lida (mg/25 mL)	Recuperação de Hidrocortisona (%)
0,1	0,1945	0,11	106,66
0,2	0,3608	0,20	98,93
0,3	0,5413	0,30	98,95
0,4	0,7134	0,39	97,81
0,5	0,9201	0,50	100,92
0,6	1,1000	0,60	100,54
<b>Média</b>			<b>100,63</b>
<b>DP</b>			<b>3,17</b>
<b>CV (%)</b>			<b>3,15</b>

Os valores da recuperação de hidrocortisona são muito próximos de 100%, sendo assim podemos concluir que o método é exato.

#### 3.3.4.2.4 Especificidade

Verificou-se que os restantes excipientes apresentaram absorvência a 258 nm. Desta forma, concluiu-se que este método não cumpre o requisito da especificidade para a hidrocortisona quando esta é incorporada nas formulações descritas.

O método doseamento espectrofotométrico da hidrocortisona cumpriu os requisitos da linearidade na gama de concentrações utilizadas, repetibilidade e exatidão. Dado que não cumpriu o requisito da especificidade, é possível utilizar este método de uma forma fiável para o doseamento da hidrocortisona libertada a partir dos hidrogéis de poloxâmero e dissolvida na solução tampão fosfato pH 7,4, desde que sejam subtraídos os valores das absorvências dos excipientes que apresentam alguma absorvência no mesmo comprimento de onda.

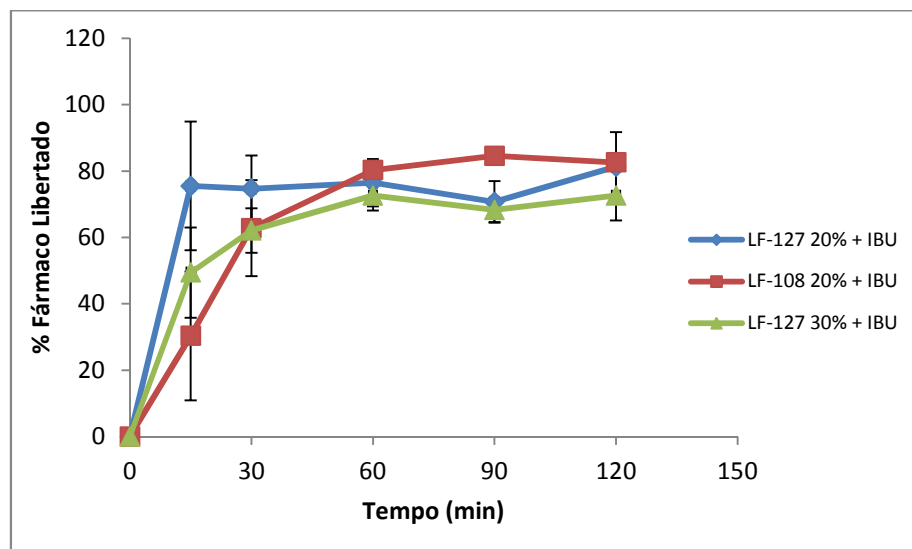
#### 3.3.4.3 Resultados dos ensaios de libertação/dissolução *in vitro*

Independentemente do poloxâmero utilizado, o hidrogéis preparados com 20% (m/m) de poloxâmero e 5% (m/m) de ibuprofeno, no final do tempo de ensaio, apresentaram uma quantidade de fármaco libertado semelhante, ou seja, cerca de 80%. No entanto, no caso do hidrogel LF-127 20%+IBU verificou-se uma libertação muito próxima de 80% (75,5%) nos primeiros 15 minutos do ensaio. Através do cálculo do

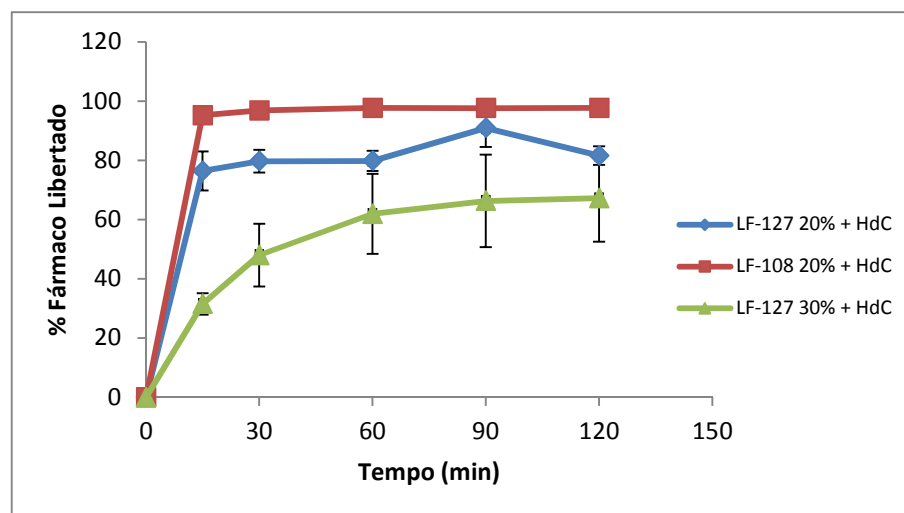


factor de semelhança conclui-se que o perfil de dissolução do LF-127 20%+IBU é diferente do perfil de dissolução do LF-108 20%+IBU ( $f_2=33,0$ ). No caso do hidrogel de LF-108 20% (m/m) contendo hidroclonazina, verificou-se uma libertação imediata do fármaco incorporado. A libertação da hidroclonazina foi mais lenta no caso dos hidrogéis preparados com LF-127.

(A)



(B)



**Figura 38.** Perfis de dissolução dos diferentes hidrogéis LF-127 e LF-108 contendo ibuprofeno (A) e hidroclonazina (B).

O aumento da concentração da LF-127 de 20 para 30% (m/m), traduziu-se numa libertação mais prolongada dos fármacos incorporados. Este facto deveu-se ao aumento da viscosidade do hidrogel devido ao aumento da concentração do poloxâmico. Os

poloxâmeros, tal como outros polímeros com propriedades tensioativas, quando dispersos num determinado solvente, em baixas concentrações existem individualmente na forma de micelas monomoleculares, mas com o aumento da concentração formam agregados multimoleculares, provocando o aumento da viscosidade [179]. Tal como descrito em outros trabalhos, este fenómeno provoca coeficientes de dissolução menores em hidrogéis com maiores concentrações de poloxâmero [179,198]. Desta forma, El-Kamel (2002) [71] preparou hidrogéis de PF 127 para a aplicação oftálmica tópica de maleato de timolol. O aumento da concentração de PF 127 de 15 para 25% (m/m) aumentou não só a viscosidade como diminuiu o coeficiente de difusão do fármaco. Da mesma forma, num estudo semelhante, Ricci *et al.* (2005) [151] veicularam a lidocaína num hidrogel de Poloxâmero 407 tendo demonstrado que o aumento da concentração do Poloxâmero traduziu-se num aumento da viscosidade do hidrogel e numa diminuição do coeficiente de difusão do fármaco a partir da matriz gelificada. Ye *et al.* (2011) [179] demonstraram claramente através de tecnologia de imagem UV que o aumento da concentração de PF 127 de 20 para 30% (m/m) em hidrogéis de administração oftálmica provocou uma diminuição efetiva do coeficiente de difusão do piroxicam através da matriz do hidrogel. Assim, conclui-se que a concentração do polímero na solução afeta não só o comportamento reológico do hidrogel, como também, o coeficiente de difusão e o tempo de dissolução do fármaco veiculado [71,151,179].

Através do cálculo do factor de semelhança conclui-se que o perfil de dissolução do LF-127 20%+IBU é diferente do perfil de dissolução do LF-127 30%+IBU ( $f_2=43,1$ ). Da mesma forma se conclui que o perfil de dissolução do LF-127 20%+HdC é diferente do perfil de dissolução do LF-127 30%+HdC ( $f_2=27,0$ ).

### 3.4 Conclusões

Os resultados dos estudos apresentados neste capítulo demonstraram que a temperatura, o tempo de armazenamento, o tipo e a concentração de polímero utilizado e a adição de diferentes fármacos, provocaram alterações nos valores do pH, na textura, no comportamento reológico e no perfil de dissolução dos fármacos incorporados nos hidrogéis constituídos pelos poloxâmeros LF-127 e LF-108. De um modo geral, os hidrogéis preparados com LF-127 apresentaram valores mais elevados de pH, firmeza, adesividade e viscosidade do que os hidrogéis preparados com LF-108. A diminuição da temperatura de ensaio de  $35\pm 2^\circ\text{C}$  para  $30\pm 2^\circ\text{C}$  provocou uma redução da firmeza e da adesividade de todos os hidrogéis testados. Contudo, no caso dos hidrogéis preparados

com LF-127 verificou-se que a viscosidade se manteve constante independentemente da temperatura de teste usada, concluindo-se que os hidrogéis preparados com este polímero foram mais resistentes à variação da temperatura.

A natureza química dos fármacos incorporados nos hidrogéis de poloxâmero influenciou os valores de pH destes. Assim, a incorporação de ibuprofeno neste tipo de hidrogéis provocou uma diminuição do valor de pH, mantendo-se estes valores constantes ao longo do tempo de armazenamento. Por sua vez, a adição de hidroclotisona mostrou um aumento dos valores de pH dos hidrogéis no início do armazenamento, tendo estes valores de pH diminuído ao longo do tempo. Nos hidrogéis preparados com 20% (m/m) de poloxâmero, verificou-se que a adição de ibuprofeno provocou um aumento da firmeza e da adesividade relativamente aos mesmos hidrogéis sem fármaco, sendo que os valores destes parâmetros aumentaram ao longo do tempo de armazenamento. Nos hidrogéis preparados com 20% (m/m) de poloxâmero, verificou-se que a adição de hidroclotisona não provocou alterações significativas nos parâmetros de textura do hidrogel ao longo do tempo de armazenamento, uma vez que a percentagem de fármaco adicionado era substancialmente inferior aos hidrogéis contendo ibuprofeno.

Os valores de viscosidade dos diferentes hidrogéis preparados com 20% (m/m) de poloxâmero e contendo 5% (m/m) de ibuprofeno aumentaram ao longo do tempo de ensaio, estando de acordo com os resultados dos parâmetros de textura. A adição de uma pequena percentagem de hidroclotisona a estes hidrogéis não provocou alterações significativas no seu comportamento reológico. Os resultados permitiram concluir que a adição de pequenas quantidades de fármacos a hidrogéis de LF-127 ou de LF-108 não afetam significativamente a textura e o comportamento reológico.

Como seria expectável, o aumento da concentração de polímero LF-127 de 20 para 30% (m/m) provocou o aumento dos valores de textura e da viscosidade dos hidrogéis, além de promover uma libertação mais prolongada dos fármacos neles incorporados.

#### **4. Desenvolvimento de um colírio baseado na associação de NLC contendo Compritol® ATO 888 e Miglyol® 812 com o polímero termossensível Pluronic® F 127**

##### **4.1 Introdução**

Como referido anteriormente, a baixa biodisponibilidade e consequente diminuta eficácia terapêutica das formulações oftálmicas de aplicação tópica convencionais pode ser provocada por diferentes fatores, entre os quais se destacam, o tempo reduzido de permanência da formulação em contacto com a superfície ocular, a falta de propriedades mucoadesivas ou o facto de a formulação apresentar pouca capacidade de penetração através dos tecidos oculares. O uso de sistemas transportadores coloidais, como as nanopartículas (quer poliméricas, quer lipídicas), aumenta a biodisponibilidade e a eficácia terapêutica dos fármacos veiculados. No entanto, os sistemas coloidais apresentam como principal desvantagem o facto de apresentarem baixa viscosidade, o que compromete o tempo de residência da formulação na superfície ocular. A adição de polímeros sensíveis a estímulos a estes sistemas coloidais, os quais sofrem transição sol-gel imediatamente após entrarem em contacto com as propriedades físico-químicas intrínsecas e específicas dos tecidos oculares, traduz-se num aumento exponencial do tempo de residência da formulação oftálmica na superfície ocular e um consequente aumento da eficácia terapêutica.

O trabalho experimental descrito neste capítulo consistiu no desenvolvimento de um colírio termossensível veiculando o ibuprofeno, tendo por base a preparação de vetores lipídicos nanoestruturados (NLC) recorrendo à técnica de emulsificação seguida de ultrasonicação, tendo sido posteriormente adicionado um polímero termossensível (PF 127) para aumentar a viscosidade e a adesividade destes transportadores coloidais.

Assim, com o objetivo de obter NLC com elevada eficácia de encapsulação e com boa estabilidade físico-química é fundamental selecionar lípidos que apresentem uma elevada solubilidade do fármaco. Esta solubilidade foi confirmada recorrendo à técnica de calorimetria diferencial de varrimento (DSC). Após a preparação das diferentes dispersões coloidais, e depois de se efetuar o ajuste do valor de pH e da osmolalidade, procedeu-se à sua caracterização, no que se refere ao tamanho médio de partículas (Z-average), índice de polidispersão (PI), potencial zeta (ZP), avaliação da estabilidade ótica por Turbiscan LAB Expert®), eficácia de encapsulação (EE) e capacidade de carga (LC) do ibuprofeno nos NLC.

De seguida e simulando as condições fisiológicas, não só em termos de temperatura como também de diluição no fluido lacrimal, procedeu-se ao ajuste da quantidade de PF 127 necessária para que a formulação gelifica-se à superfície ocular, imediatamente após a sua administração. Procedeu-se à análise dos parâmetros de textura e à análise reológica das diferentes formulações simulando as condições fisiológicas. A toxicidade dos sistemas desenvolvidos foi efetuada através da realização de ensaios de biocompatibilidade utilizando a linha celular de retinoblastoma humano Y-79 tendo por base a redução do reagente Alamar Blue. Por fim, procedeu-se à realização de ensaios os ensaios de libertação *in vitro* de forma a avaliar a libertação do ibuprofeno a partir das diferentes formulações ao longo do tempo.

#### 4.2 Materiais e Métodos

A lista de matérias-primas, reagentes e equipamentos utilizados nos ensaios descritos neste capítulo está indicada no capítulo 2. De igual modo, os métodos utilizados neste capítulo (estudo de compatibilidade e solubilidade lipídica, determinação do pH e da osmolalidade, determinação da temperatura de transição de fase solução-gel, determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta, avaliação da estabilidade das dispersões lipídicas na presença de fluido lacrimal artificial, determinação da morfologia das nanopartículas por microscopia eletrónica de varrimento de alta resolução a baixa temperatura (cryoSEM), avaliação da estabilidade ótica das dispersões coloidais (Turbiscan LAB Expert®), determinação da eficácia de encapsulação e da capacidade de carga das NLC, análise térmica por calorimetria diferencial de varrimento (DSC), análise dos parâmetros da textura antes e depois da diluição em fluido lacrimal artificial, análise reológica antes e depois da diluição em fluido lacrimal artificial, estudos de biocompatibilidade: ensaio da redução do Alamar Blue e os ensaios de libertação/dissolução *in vitro*) foram realizados de acordo com as metodologias descritas no capítulo anterior.

## 4.3 Resultados e Discussão

### 4.3.1 Estudo da compatibilidade e solubilidade lipídica

De forma a preparar NLC com elevada eficácia de encapsulação, com boa capacidade de carga do fármaco a veicular e com boa estabilidade físico-química, é muito importante que os lípidos utilizados na preparação destas NLC apresentem uma elevada capacidade de solubilização do fármaco [14,262,319,346]. De forma a não termos qualquer tipo de dúvida relativamente à solubilização do ibuprofeno nos lípidos selecionados, a solubilização lipídica foi testada utilizando duas concentrações de fármaco, 0,1 e 1% (m/m). Os resultados do estudo de solubilização lipídica demonstraram que o lípido sólido (Compritol®) e o lípido líquido (Miglyol® 812) solubilizaram o ibuprofeno, independentemente da concentração de fármaco utilizada. Estes resultados foram confirmados através da realização de análises de calorimetria diferencial de varrimento (DSC).

De acordo com os resultados dos estudos de solubilidade lipídica, procedeu-se à preparação das diferentes dispersões de NLC de acordo com a Tabela XV.

**Tabela XV.** Composição das diferentes dispersões de NLC (P - Placebo; i - Ibuprofeno; NLC<sub>P</sub> - NLC placebo; NLC<sub>i</sub> – NLC encapsulando o ibuprofeno; NLC<sub>i</sub>-PF 127 n% – NLC encapsulando o ibuprofeno contendo diferentes percentagens (m/m) de polímero termossensível).

Composição (% m/m)	NLC <sub>P</sub>	NLC <sub>i</sub>	NLC <sub>i</sub> PF127 9%	NLC <sub>i</sub> PF127 12%	NLC <sub>i</sub> PF 127 15%	NLC <sub>i</sub> PF 127 18%
Compritol® ATO 888	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
Miglyol® 812	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Ibuprofeno	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Tween® 80	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Brometo de Cetiltrimetilamónio (CTAB)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
PF 127	-	-	9	12	15	18
Água Ultrapura	q.b.p. 100	q.b.p. 100	q.b.p. 100	q.b.p. 100	q.b.p. 100	q.b.p. 100

A Figura 39 ilustra o aspeto final de algumas das dispersões coloidais preparadas nesta etapa do trabalho experimental.



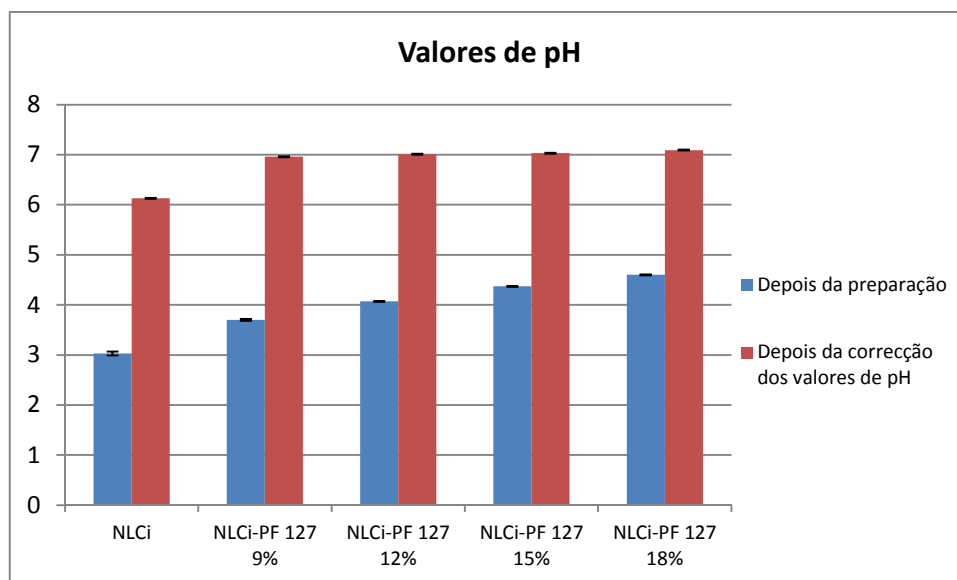
**Figura 39.** Aspeto final das dispersões de NLC preparadas com Compritol® ATO 888 e Miglyol® 812.

#### 4.3.2 Caracterização das dispersões coloidais

##### 4.3.2.1 Determinação e correção do pH e da osmolalidade

Como se pode verificar na Figura 40, depois da preparação, as diferentes dispersões coloidais com e sem a adição do polímero termossensível PF 127 apresentaram valores de pH inferiores a 5 devido à adição do ibuprofeno. Como seria de esperar, o ibuprofeno sendo um derivado do ácido propanóico, causou uma diminuição dos valores de pH das diferentes dispersões coloidais [186,356]. Pelo contrário, a adição de polímero PF 127 à dispersão coloidal original provocou um aumento do valor de pH da formulação. De realçar que à medida que se aumentou a percentagem de PF 127 nas dispersões coloidais, verificou-se um aumento dos valores de pH.

Com o objetivo de aumentar os valores de pH das diferentes formulações oftálmicas para valores de pH o mais próximo possível do valor de pH fisiológico, procedeu-se ao acerto dos valores de pH com recurso à adição de solução de NaOH 1 M [14,356]. O ajustamento do valor de pH das diferentes dispersões coloidais para valores próximos do valor de pH fisiológico evita que estas formulações oftálmicas depois de administradas causem qualquer tipo de irritação ocular, desconforto ou lacrimação [14,356]. Depois de realizado o ajustamento do valor de pH, todas as formulações apresentaram valores finais de  $7,0 \pm 1,0$ .



**Figura 40.** Valores de pH das diferentes dispersões NLC<sub>i</sub> preparadas com diferentes percentagens de PF 127, depois da sua preparação e após o ajustamento do valor de pH (Média ± DP, n=3).

A isotonia das diferentes dispersões coloidais foi obtida com a adição de aproximadamente 0,7% (m/m) de NaCl. Depois de assegurar que as diferentes dispersões coloidais preparadas apresentavam valores de pH neutros e se encontravam isotónicas, estas foram armazenadas no frigorífico a 4°C.

#### 4.3.2.2 Determinação da temperatura de transição de fase solução-gel

O uso de dispersões coloidais aumenta a biodisponibilidade do fármaco veiculado nos tecidos oculares devido às suas propriedades bioadesivas e à capacidade deste tipo de formas farmacêuticas penetrarem através dos tecidos oculares, uma vez que apresentam uma escala nanométrica [14,27,32,39,344]. Apesar disso, a maior desvantagem das dispersões coloidais é a sua baixa viscosidade [272,274].

De forma a aumentar a biodisponibilidade das formulações oftálmicas, a temperatura de transição sol-gel da formulação oftálmica deve ocorrer a temperaturas inferiores a 35°C (temperatura da superfície ocular), devendo esta transição ter lugar imediatamente após a formulação contactar com a superfície ocular [14,15,344]. A Tabela XVI ilustra as temperaturas de transição sol-gel das diferentes dispersões coloidais NLC<sub>i</sub> com diferentes percentagens de polímero termossensível PF 127, com e sem diluição em fluido lacrimal artificial na proporção de 40:7.



**Tabela XVI.** Temperaturas de transição sol-gel das diferentes dispersões NLC<sub>i</sub> preparadas com diferentes percentagens de PF 127 (Média ± DP, n=3).

	NLC <sub>i</sub> -PF 127 9%	NLC <sub>i</sub> -PF 127 12%	NLC <sub>i</sub> -PF 127 15%	NLC <sub>i</sub> -PF 127 18%
<b>Formulação original (°C)</b>	> 50,0	19,7 ± 0,6	18,3 ± 0,6	14,0 ± 2,0
<b>Depois da diluição em STF (°C)</b>	> 50,0	> 50,0	28,3 ± 0,6	19,0 ± 1,0

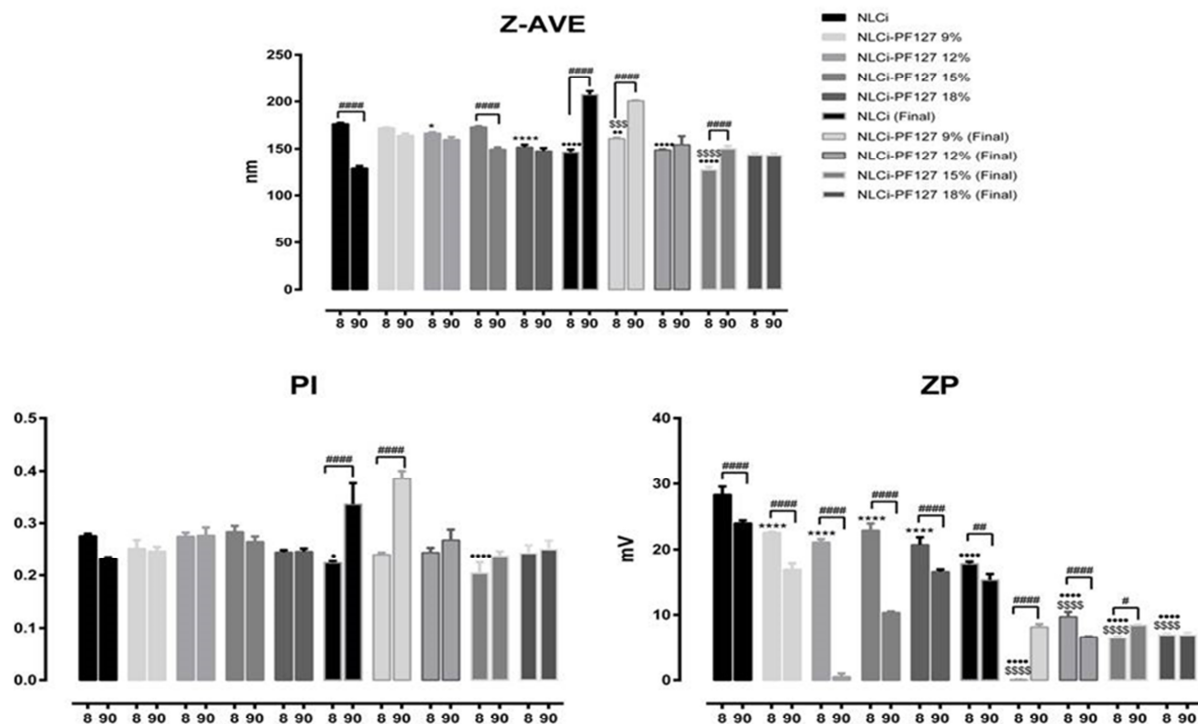
Como se pode verificar na Tabela XVI, a formulação NLC<sub>i</sub>-PF127 9% , com e sem diluição em fluido lacrimal artificial, não apresentou uma transição sol-gel até à temperatura de 50°C. As formulações NLC<sub>i</sub>-PF127 com uma quantidade de PF 127 de 12, 15 e 18% (m/m) sem diluição em fluido lacrimal artificial apresentaram temperaturas de transição sol-gel inferiores a 35°C. Como seria de esperar, o aumento da percentagem de polímero PF 127 na dispersão coloidal traduziu-se numa diminuição da temperatura de transição sol-gel.

Quando se procedeu à diluição destas dispersões coloidais em fluido lacrimal artificial na proporção de 40:7, somente as dispersões coloidais com uma percentagem de PF 127 igual ou superior a 15% (m/m) apresentaram uma temperatura de transição sol-gel inferior a 35°C. Simulando as condições fisiológicas, a formulação NLC<sub>i</sub>-PF127 15% (m/m) apresentou uma temperatura de transição sol-gel de 28,3±0,6°C, ou seja, inferior à temperatura registada à superfície ocular (35°C). A formulação NLC<sub>i</sub>-PF127 18% (m/m), simulando as condições fisiológicas apresentou uma temperatura de transição de fase sol-gel muito baixa, inferior a 20°C. No entanto, uma concentração mais elevada de polímero termossensível poderia causar problemas na administração da formulação oftálmica.

Assim, e de acordo com os resultados obtidos, verificou-se que a dispersão coloidal com uma concentração de PF 127 de 15% (m/m) assegura, em condições *in vivo*, a gelificação imediata da formulação oftálmica quando esta entra em contacto com a superfície ocular.

#### 4.3.2.3 Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta

A Figura 41 ilustra os resultados do tamanho de partícula expressos como Z-average, a distribuição do tamanho das partículas expressos como índice de polidispersão (PI) e o valor da carga elétrica da superfície expresso como potencial zeta (ZP) das diferentes dispersões colidais determinadas recorrendo à técnica de dispersão dinâmica da luz (DLS).



Formulações/Parâmetros	8 dias após a produção e armazenadas a 4°C			90 dias após a produção e armazenadas a 4°C		
	Z-Ave (nm)	PI	ZP (mV)	Z-Ave (nm)	PI	ZP (mV)
NLC <sub>i</sub>	176,4 ± 1,1	0,276 ± 0,004	28,33 ± 1,23	128,9 ± 2,3	0,232 ± 0,003	24,00 ± 0,44
NLC <sub>i</sub> -PF127 9%	172,1 ± 0,7	0,252 ± 0,016	22,60 ± 0,10	164,2 ± 2,1	0,247 ± 0,008	16,87 ± 0,93
NLC <sub>i</sub> -PF127 12%	166,6 ± 1,1	0,275 ± 0,007	21,13 ± 0,47	159,8 ± 2,7	0,277 ± 0,015	0,52 ± 0,49
NLC <sub>i</sub> -PF127 15%	173,1 ± 1,0	0,284 ± 0,011	22,93 ± 1,04	149,5 ± 2,2	0,265 ± 0,010	10,37 ± 0,15
NLC <sub>i</sub> -PF127 18%	151,6 ± 2,9	0,245 ± 0,004	20,73 ± 1,14	147,6 ± 3,2	0,246 ± 0,006	16,53 ± 0,35
NLC <sub>i</sub> (Final)	146,4 ± 3,0	0,224 ± 0,003	17,70 ± 0,35	207,0 ± 4,1	0,326 ± 0,040	15,27 ± 0,90
NLC <sub>i</sub> -PF127 9% (Final)	160,9 ± 1,0	0,240 ± 0,004	0,05 ± 0,04	200,7 ± 0,4	0,385 ± 0,015	8,14 ± 0,46
NLC <sub>i</sub> -PF127 12% (Final)	148,7 ± 0,9	0,244 ± 0,009	9,72 ± 0,73	154,3 ± 9,1	0,268 ± 0,020	6,61 ± 0,07
NLC <sub>i</sub> -PF127 15% (Final)	127,0 ± 3,2	0,204 ± 0,021	6,47 ± 0,22	150,0 ± 3,1	0,237 ± 0,009	8,44 ± 0,07
NLC <sub>i</sub> -PF127 18% (Final)	143,6 ± 1,7	0,243 ± 0,015	6,95 ± 0,19	143,3 ± 1,9	0,250 ± 0,017	6,91 ± 0,39

(Nota: Formulações Finais - formulações isotônicas com valor de pH neutro)

**Figura 41.** Valores de Z-ave, Índice de Polidispersão (PI) e Potencial Zeta (ZP) das diferentes dispersões NLC<sub>i</sub> medidos 8 e 90 dias após a sua preparação. Os diferentes resultados foram expressos como média ± DP, realizados em triplicado. As comparações estatísticas foram efetuadas recorrendo ao Two-way ANOVA, seguido do *Tukey's multiple comparisons test* [Z-ave - \*p<0,05; \*\*\*\*p<0,0001 vs. NLC<sub>i</sub> 8 dias; \$\$\$p<0,001;

\$\$\$ $p < 0,0001$  vs. NLC<sub>i</sub> (Final) 8 dias; •• $p < 0,01$ ; ••• $p < 0,0001$  Formulação 8 dias vs. Formulação (Final) 8 dias; #### $p < 0,0001$  8 dias vs. 90 dias; **PI** - • $p < 0,05$ ; •••  $p < 0,0001$  Formulação 8 dias vs. Formulação (Final) 8 dias; #### $p < 0,0001$  8 dias vs. 90 dias; **ZP** - \*\*\*\* $p < 0,0001$  vs. NLC<sub>i</sub> 8 dias; \$\$\$ $p < 0,0001$  vs. NLC<sub>i</sub> (Final) 8 dias; ••• $p < 0,0001$  Formulação 8 dias vs. Formulação (Final) 8 dias; # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$ ; #### $p < 0,0001$  8 dias vs. 90 dias].

Oito dias após a preparação, os NLC<sub>i</sub> apresentaram um tamanho médio aproximado de 180 nm, um valor de índice de polidispersão (PI) abaixo de 0,28 e um potencial zeta (ZP) positivo em torno de 28 mV. Nanopartículas com um tamanho situado entre 50 e 400 nm são suscetíveis de serem administradas topicamente sob a forma de colírio sem causarem qualquer tipo problema de irritação ou desconforto, promovendo a mucoadesão, sendo capazes de penetrar através dos tecidos oculares [32,39,45,46,81,267,272].

Como é possível verificar na Figura 41, todas as dispersões coloidais preparadas apresentaram valores de índice de polidispersão (PI) inferiores a 0,3, o que indica que estamos na presença de monodispersões, com partículas com tamanhos homogêneos, com pouca variabilidade e sem fenômenos de agregação [39,272,314,319,392]. Por outro lado, as dispersões coloidais preparadas apresentaram um potencial zeta (ZP) positivo, podendo desta forma, estabelecer interações eletrostáticas com a mucina, glicoproteína presente nos tecidos oculares e que apresenta carga elétrica negativa, aumentando desta forma o tempo de residência pré-corneal das formulações oftálmicas [25,43,81,278,281]

O potencial zeta (ZP) da dispersão coloidal NLC<sub>i</sub> foi próximo dos + 30 mV. Formulações com potenciais zeta desta ordem de grandeza são consideradas estáveis, uma vez que as repulsões eletrostáticas entre as partículas com a mesma carga elétrica não permitem a ocorrência de fenômenos de agregação [174,271,314,318]. Tal como era de esperar, a adição de um polímero termossensível não iônico, como o PF127, às dispersões coloidais provocou uma diminuição dos valores de potencial zeta (ZP). Como se pode verificar na Figura 41, a aplicação da análise de variância, permitiu concluir que a adição do PF 127 em diferentes concentrações à dispersão coloidal, provocou alterações estatisticamente significativas nos valores do ZP. Este fenómeno ocorre porque a rede polimérica do polímero cobre a superfície das NLC, “camuflando” a carga elétrica da superfície das nanopartículas.

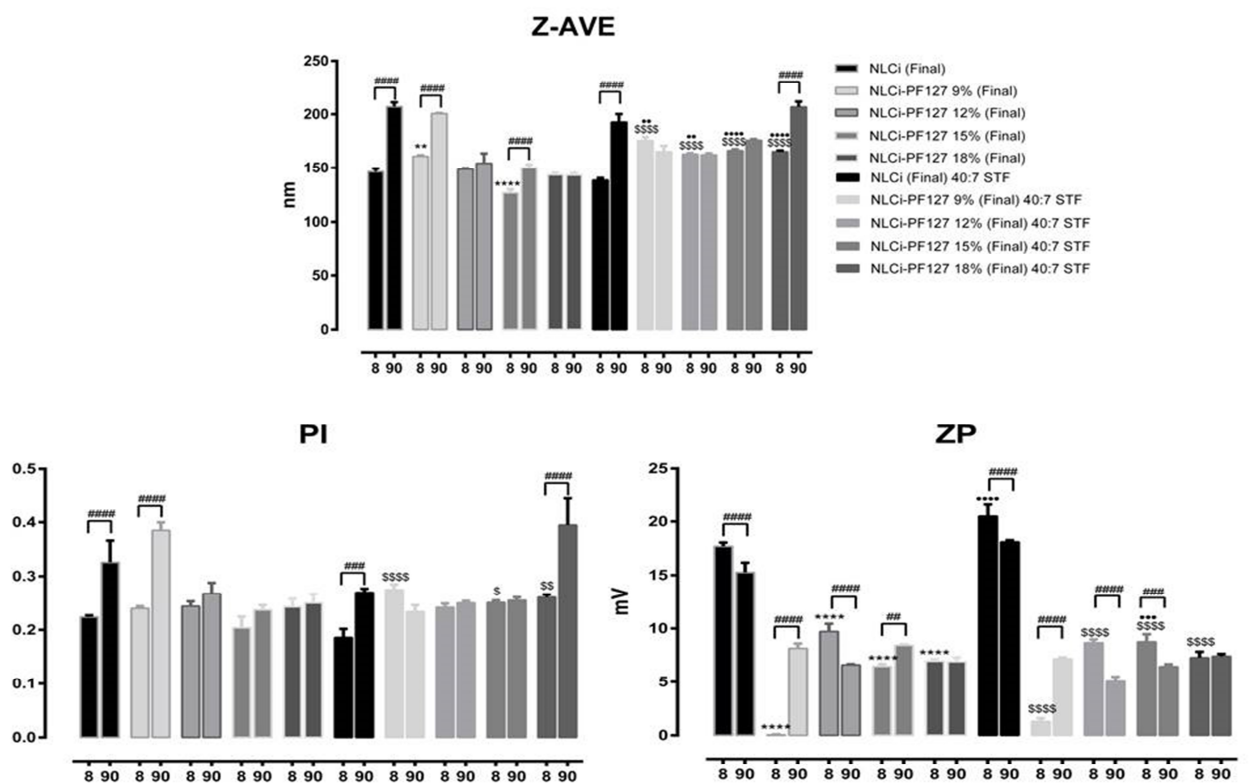
A adição de NaOH 1 M com o objetivo de se proceder ao ajustamento do pH e a adição de NaCl com o intuito de tornar as dispersões coloidais isotónicas, provocou uma

diminuição dos valores do potencial zeta (ZP), concluindo-se através da aplicação da análise de variância que estas alterações são estatisticamente significativas. Conclui-se, desta forma, que a adição destes contra-íons neutraliza as cargas elétricas existentes à superfície das nanopartículas lipídicas. Verifica-se também que, através da aplicação da análise de variância, a adição de NaOH 1 M e NaCl provocou uma diminuição significativa do Z-ave, à exceção da dispersão coloidal que contém 18% de PF 127.

A estabilidade física das diferentes dispersões coloidais foi avaliada 90 dias depois da sua produção, sendo que através da aplicação da análise de variância verificou-se que se registaram alterações estatisticamente significativas principalmente no valor de ZP das diferentes dispersões coloidais. No entanto, conclui-se que, após os 90 dias de armazenamento, os diferentes NLC mantêm propriedades físico-químicas susceptíveis de serem administradas por via oftálmica.

#### 4.3.2.4 Avaliação da estabilidade das dispersões lipídicas na presença de fluido lacrimal artificial

Como se pode verificar na Figura 42, a diluição das diferentes dispersões coloidais em fluido lacrimal artificial na proporção de 40:7 provocou alterações estatisticamente significativas principalmente no tamanho (Z-ave) e no potencial zeta (ZP) das dispersões coloidais. Salienta-se que no que se refere ao Z-ave, a diluição das dispersões coloidais no STF de forma a simular as condições fisiológicas, provocou o aumento do tamanho das nanopartículas nas dispersões coloidais com polímero. No entanto, concluiu-se que, simulando as condições fisiológicas, as dispersões coloidais com e sem PF 127 apresentam propriedades físico-químicas susceptíveis de ser administradas por via oftálmica tópica sem causarem qualquer tipo de irritação ou desconforto. Assegurar a manutenção das propriedades físico-químicas das dispersões coloidais, em condições fisiológicas, principalmente no que diz respeito ao tamanho e ao potencial zeta, é fundamental para se poder tirar partido das vantagens da utilização deste tipo de transportador coloidal.



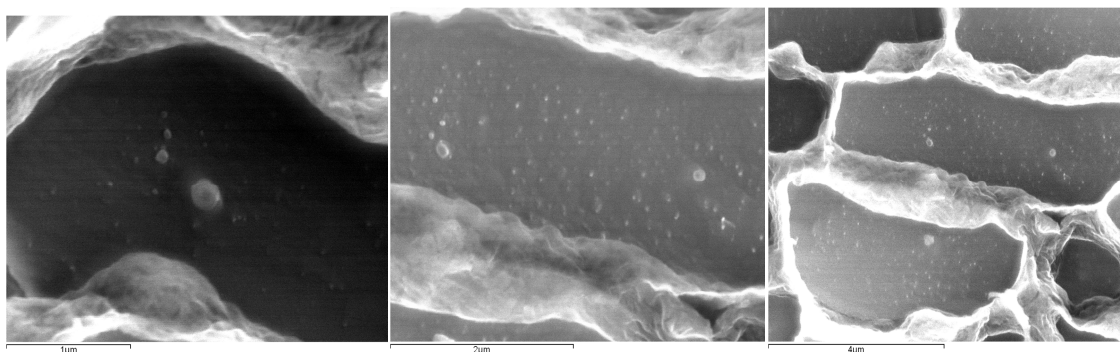
Formulações	8 dias após a produção e armazenadas a 4°C			90 dias após a produção e armazenadas a 4°C		
	Z-Ave (nm)	PI	ZP (mV)	Z-Ave (nm)	PI	ZP (mV)
NLC <sub>i</sub> (Final) 40:7 STF	138,5 ± 2,0	0,186 ± 0,016	20,50 ± 1,18	192,6 ± 7,6	0,270 ± 0,007	18,10 ± 0,17
NLC <sub>i</sub> -PF127 9% (Final) 40:7 STF	175,5 ± 3,3	0,275 ± 0,010	1,30 ± 0,31	165,2 ± 5,4	0,234 ± 0,012	7,16 ± 0,15
NLC <sub>i</sub> -PF127 12% (Final) 40:7 STF	162,8 ± 1,1	0,242 ± 0,007	8,67 ± 0,32	162,3 ± 1,5	0,250 ± 0,004	5,05 ± 0,44
NLC <sub>i</sub> -PF127 15% (Final) 40:7 STF	166,2 ± 1,3	0,251 ± 0,004	8,75 ± 0,72	175,8 ± 1,1	0,255 ± 0,006	6,45 ± 0,21
NLC <sub>i</sub> -PF127 18% (Final) 40:7 STF	165,2 ± 1,2	0,261 ± 0,005	7,27 ± 0,55	206,7 ± 5,2	0,395 ± 0,051	7,41 ± 0,22

**Figura 42.** Efeito da adição de fluido lacrimal artificial (STF) na proporção de 40:7 nos valores de Z-ave, Índice de Polidispersão (PI) e Potencial Zeta (ZP) das diferentes dispersões NLC<sub>i</sub> medidos 8 e 90 dias após a sua preparação. Os diferentes resultados foram expressos como média ± DP, realizados em triplicado. As comparações estatísticas foram efetuadas recorrendo ao Two-way ANOVA, seguido do *Tukey's multiple comparisons test* [**Z-ave** - \*\*p<0,01; \*\*\*\* p<0,0001 vs. NLC<sub>i</sub> (Final) 8 dias; \$\$\$\$p<0,0001 vs. NLC<sub>i</sub> (Final) 40:7 STF 8 dias; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,0001 Formulação (Final) 8 dias vs. Formulação (Final) 40:7 STF 8 dias; ####p<0,0001 8 dias vs. 90 dias; **PI** - \$p<0,05; \$\$p<0,01; \$\$\$p<0,0001 vs. NLC<sub>i</sub> (Final) 40:7 STF 8 dias; ###p<0,001; ####p<0,0001 8 dias vs. 90 dias; **ZP** - \*\*\*\* p<0,0001 vs. NLC<sub>i</sub> (Final) 8 dias; \$\$\$p<0,0001 vs. NLC<sub>i</sub> (Final) 40:7 STF 8 dias; \*\*p<0,001; \*\*\*p<0,0001 Formulação (Final) 8 dias vs.

Formulação (Final) 40:7 STF 8 dias;  $^{##}p<0,01$ ;  $^{###}p<0,001$ ;  $^{####}p<0,0001$  8 dias vs. 90 dias].

#### 4.3.2.5 Determinação da morfologia das nanopartículas por microscopia eletrónica de varrimento de alta resolução a baixa temperatura (cryoSEM)

As dispersões coloidais NLC<sub>i</sub> e NLC<sub>i</sub>-PF 127 15% (m/m) foram analisadas por microscopia eletrónica de varrimento de alta resolução a baixa temperatura (cryoSEM) com o objetivo de observar a forma, a morfologia da superfície e o tamanho das nanopartículas lipídicas. A Figura 43 mostra a morfologia da superfície e dá informações úteis sobre o tamanho das NLC<sub>i</sub>.



**Figura 43.** Imagens de CryoSEM das dispersões NLC<sub>i</sub> (ampliação de 40000x).

Como seria de esperar, as nanopartículas lipídicas apresentaram uma forma esférica, sem fenómenos de agregação visíveis, tendo sido confirmados os tamanhos de partícula medidos através da técnica de DLS. A adição de 15% (m/m) de PF 127 à dispersão coloidal fez com que não fosse possível a observação das nanopartículas lipídicas. A elevada quantidade de polímero termossensível adicionado à dispersão coloidal promoveu a formação de uma rede polimérica densa que tornou impossível a visualização das nanopartículas lipídicas.

#### 4.3.2.6 Avaliação da estabilidade ótica das dispersões coloidais (Turbiscan LAB Expert®)

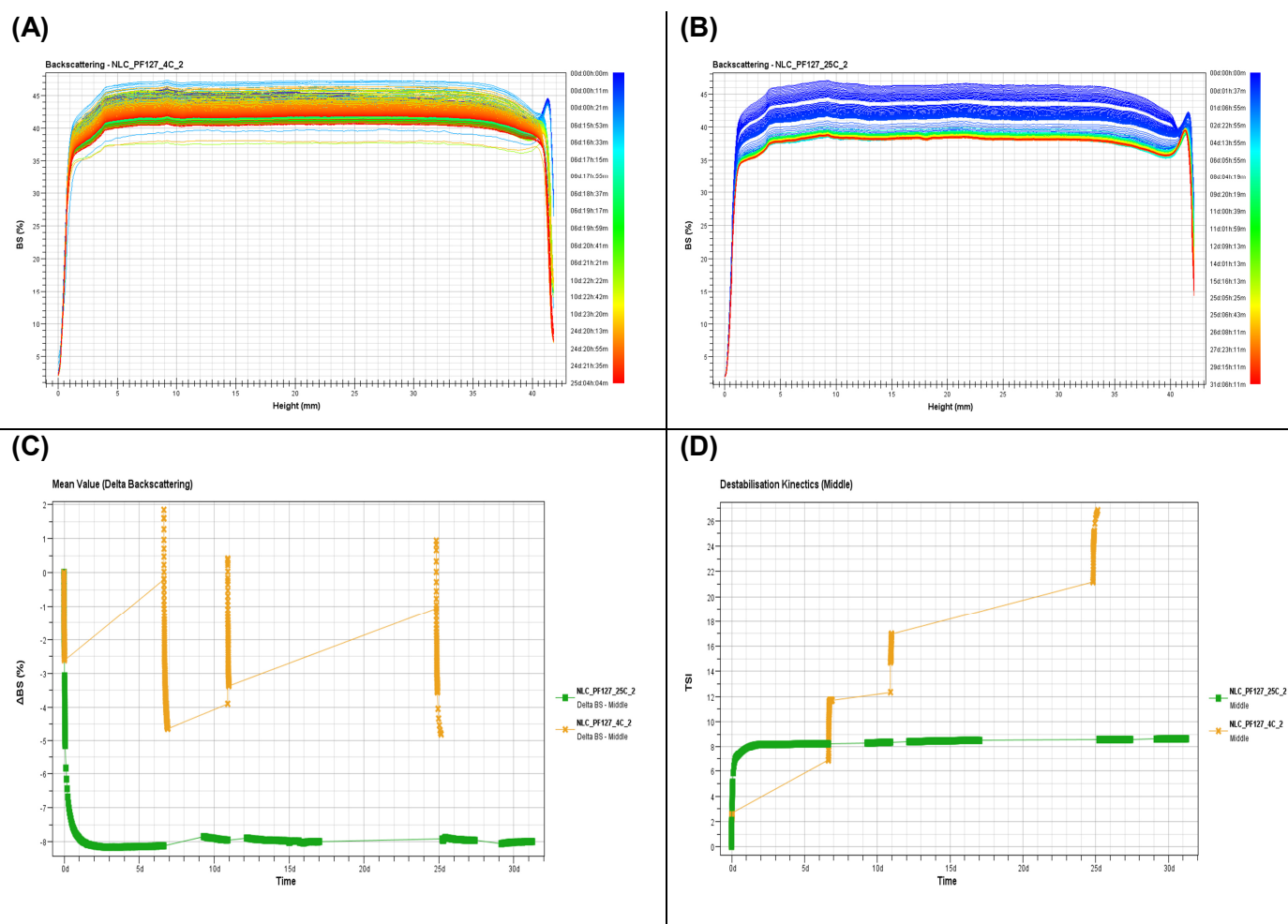
Como referido anteriormente, a avaliação da estabilidade ótica das dispersões coloidais recorrendo à técnica de Turbiscan LAB Expert® é uma excelente forma de detetar mudanças no estado das dispersões coloidais, como sejam, fenómenos de

destabilização, migração de partículas (floculação e sedimentação) e alterações no tamanho das partículas antes de se tornarem visíveis [281].

Recorrendo a esta técnica é possível avaliar a estabilidade física das dispersões coloidais sem que seja necessário diluir a amostra. Como as dispersões coloidais apresentavam uma aspeto leitoso, o sinal de transmitância foi 0 (% T=0), e desta forma, a estabilidade física deste tipo de dispersões foi avaliada recorrendo ao sinal de BS. Alterações no sinal BS em função da altura da amostra ou em função do tempo são devidas a variações no tamanho ou à migração das partículas [279,281,343,366,393]. Assim, quando ocorre a sedimentação das partículas (movimentação das partículas para o fundo da amostra) verifica-se um aumento do sinal de BS no fundo da amostra (pico positivo), verificando-se o contrário no topo da amostra (pico negativo) [279,281,343,366,393]. Por outro lado, quando ocorrem fenómenos de floculação ou desnatação, verifica-se que o sinal de BS no fundo da amostra diminui (pico negativo), verificando-se um aumento do sinal BS no topo da amostra (pico positivo) [279,281,343,366,393]. Além disso, mudanças generalizadas no sinal BS ao longo de toda a altura da amostra indicam alterações no tamanho ou agregação das partículas [279,393].

A Figura 44 ilustra os perfis de BS em função da altura da amostra (mm), os perfis de BS em função do tempo (dias) e os perfis de TSI (índice de estabilidade de Turbiscan) em função do tempo (dias). Os ensaios foram realizados à amostra NLC<sub>i</sub>-PF 127 15% (m/m) a duas temperaturas, 4°C (temperatura de armazenamento) e 25°C (temperatura ambiente), em diferentes dias após a sua produção (0, 7, 15, 30 dias).





**Figura 44.** Perfis de BS em função da altura da amostra (mm), realizados a duas temperaturas, 4°C **(A)** e 25°C **(B)**; perfis de BS em função do tempo (dias) **(C)** e perfis de TSI em função do tempo (dias) **(D)** da dispersão NLC-*PF127* 15% realizados em diferentes dias após a sua produção (0, 7, 15, 30 dias).

De acordo com a Figura 44, após a estabilização da temperatura, não se verificaram alterações significativas no sinal BS compatíveis com separação de fases (desnatação ou sedimentação) ou com a variação do tamanho das partículas (coalescência, floculação). De facto, pode ser observada uma pequena diminuição do sinal BS nas primeiras horas (inferior a 10%), o que pode indicar um fenómeno de coalescência da amostra armazenada a 25°C, mas verifica-se uma estabilização do sinal BS ao longo do tempo de ensaio, mantendo-se o valor  $\Delta BS$  estável durante os dias subsequentes. Este fenómeno deve-se à natureza termossensível do polímero *PF 127* adicionado à dispersão coloidal, uma vez que este fenómeno também acontece na amostra armazenada à temperatura de 4°C, de cada vez que a amostra era reaquecida

para a execução do ensaio de Turbiscan. Independentemente da temperatura de armazenamento da amostra, os ensaios realizados por Turbiscan efetuaram-se sempre a uma temperatura de 25°C. Assim, como a temperatura de ensaio do Turbiscan é de 25°C, verifica-se sempre uma reorganização da rede polimérica devido à variação da temperatura, o que resulta numa variação do sinal de BS lido. Desta forma, existe uma reversibilidade deste fenómeno relacionada com a temperatura, a qual é consistente com o comportamento do polímero usado. Na amostra armazenada a 25°C, somente nas primeiras horas do dia de produção (dia 0) se verificou este fenómeno, isto porque a incorporação do polímero na dispersão coloidal foi realizada a temperaturas baixas, como forma de favorecer a incorporação do polímero na dispersão coloidal.

O perfil de TSI confirma o que foi dito anteriormente. Foram verificadas variações nos valores de TSI na amostra armazenada a 4°C, as quais estão relacionadas com a natureza termossensível do polímero e não com a instabilidade da formulação. Na formulação armazenada a 25°C, os valores de TSI mostraram uma variação nas primeiras horas do dia 0, que depois se manteve constante durante todo o tempo de execução do ensaio.

Conclui-se que, depois da estabilização inicial da formulação que se verifica nas primeiras horas após a sua preparação, a formulação foi considerada fisicamente estável ( $\Delta BS$  foi sempre inferior a 10%) durante o período de ensaio. Estes resultados estão de acordo com os resultados de DLS, nos quais, após 90 dias de armazenamento, não foram detetadas alterações significativas nas propriedades físico-químicas das dispersões coloidais.

#### 4.3.2.7 Determinação da eficácia de encapsulação e da capacidade de carga dos NLC

##### 4.3.2.7.1 Validação do método de doseamento do ibuprofeno

###### 4.3.2.7.1.1 Estudo da linearidade da resposta do detetor

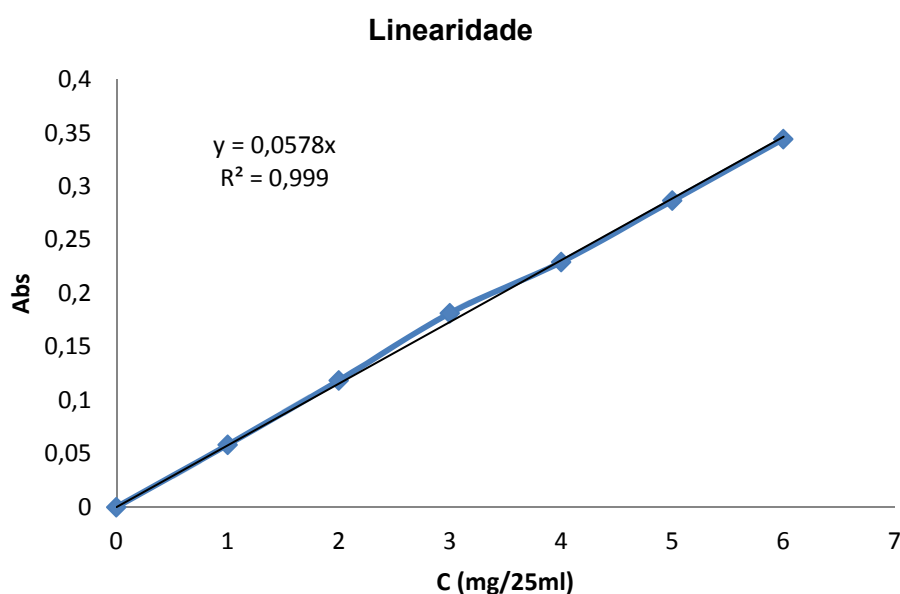
Antes de se proceder à avaliação da eficácia de encapsulação do ibuprofeno nas NLC foi efetuada a validação do método de doseamento. Desta forma, para efetuar o estudo da linearidade da resposta do detetor foram preparadas 6 soluções padrão de ibuprofeno em solução tampão fosfato pH 7,4 com as seguintes concentrações: 20% (1 mg/25 mL), 40% (2 mg/25 mL), 60% (3 mg/25 mL), 80% (4 mg/25 mL), 100% (5 mg/25 mL) e 120% (6 mg/25 mL).

Na Tabela XVII apresentam-se os valores das absorvências obtidos para cada uma das soluções padrão preparadas.

**Tabela XVII.** Valores das absorvências lidas para o estudo de linearidade da resposta do detetor do método de doseamento espectrofotométrico do ibuprofeno.

C (%)	C (mg/25 mL)	Abs (272 nm)
0	0	0
20	1	0,0584
40	2	0,1186
60	3	0,1816
80	4	0,2293
100	5	0,2868
120	6	0,3444

A Figura 45 ilustra a representação gráfica dos valores das absorvências lidas em função das concentrações padrão de ibuprofeno.



**Figura 45.** Representação gráfica da reta de calibração relativa ao estudo da linearidade da resposta do detetor do método de doseamento espectrofotométrico do ibuprofeno.

A partir desta representação gráfica determinou-se o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), os valores da ordenada na origem e o declive da reta. O coeficiente de determinação foi de 0,999, concluindo-se desta forma, que existe uma correlação linear

entre as absorvências lidas e as diferentes concentrações das soluções padrão de ibuprofeno.

#### 4.3.2.7.1.2 Estudo da precisão

Os estudos da precisão basearam-se na determinação da repetibilidade e, para isso, procedeu-se à leitura da absorvência de 6 amostras da solução padrão de ibuprofeno com uma concentração de 100%, ou seja, 5 mg/25 ml. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela XVIII.

**Tabela XVIII.** Avaliação da repetibilidade do método de doseamento espectrofotométrico do ibuprofeno.

<b>Amostra</b>	<b>Valor de Abs lido</b>
1	0,2868
2	0,2854
3	0,2860
4	0,2865
5	0,2862
6	0,2857
<b>Média</b>	<b>0,2861</b>
<b>DP</b>	<b>0,0005</b>
<b>CV (%)</b>	<b>0,1796</b>

Este método apresentou um desvio padrão de 0,0005 e um coeficiente de variação de 0,1796. Como o coeficiente de variação (CV) é inferior a 2%, concluiu-se que o método é preciso no que diz respeito à repetibilidade.

#### 4.3.2.7.1.3 Estudo da exatidão

Na Tabela XIX estão representados os resultados do estudo de exatidão.

**Tabela XIX.** Avaliação da exatidão do método de doseamento espectrofotométrico do ibuprofeno.

Conc. teórica (mg/25 mL)	Abs. Lida	Conc. Lida (mg/25 mL)	Recuperação de Ibuprofeno (%)
1	0,0584	1,01	101,04
2	0,1186	2,05	102,60
3	0,1816	3,14	104,73
4	0,2293	3,97	99,18
5	0,2868	4,96	99,24
6	0,3444	5,96	99,31
<b>Média</b>			101,01
<b>DP</b>			2,27
<b>CV (%)</b>			2,25

Os valores da recuperação de ibuprofeno são muito próximos de 100%, sendo assim podemos concluir que o método é exato.

#### 4.3.2.7.1.4 Especificidade

Verificou-se que os restantes excipientes apresentaram absorvência a 272 nm. Desta forma, concluiu-se que este método não apresenta especificidade para o ibuprofeno quando incorporado nas formulações descritas.

O método de doseamento espectrofotométrico do ibuprofeno cumpriu os requisitos da linearidade na gama de concentrações utilizadas, repetibilidade e exatidão. Dado que não cumpre o requisito da especificidade, é possível utilizar este método de uma forma fiável para o doseamento do ibuprofeno encapsulado, desde que sejam subtraídos os valores das absorvências dos excipientes que apresentam alguma absorvência no mesmo comprimento de onda.

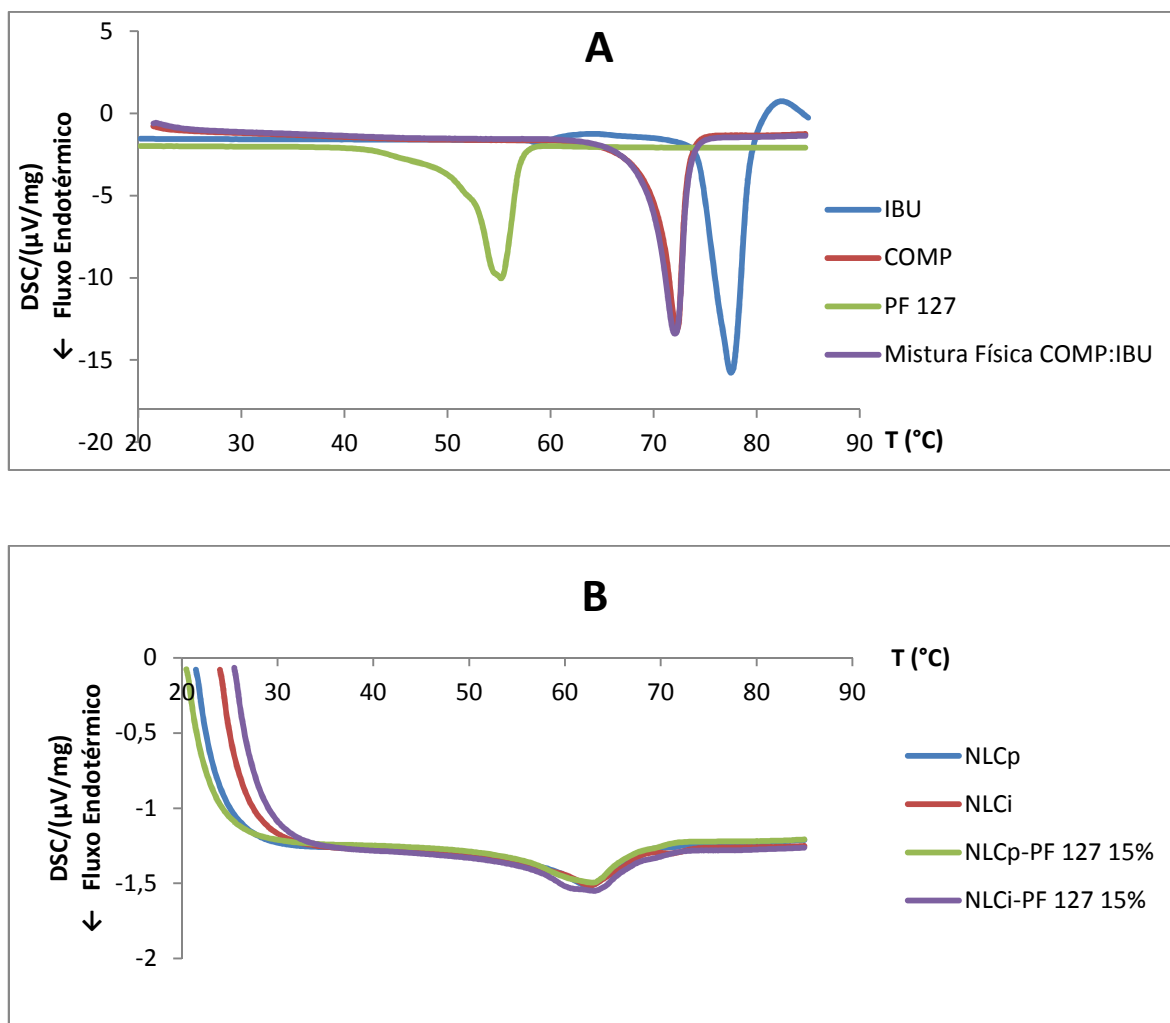
#### 4.3.2.7.2 Resultados da eficácia de encapsulação e da capacidade de carga dos NLC

A eficácia de encapsulação (EE) e a capacidade de carga (LC) das nanopartículas lipídicas foi realizada indiretamente através do cálculo do ibuprofeno livre presente na fase aquosa da dispersão coloidal. A solução tampão fosfato pH 7,4 foi escolhida como solvente, uma vez que é reconhecido o poder de solubilização do ibuprofeno nesta solução [186,394]. Desta forma, a eficácia de encapsulação dos NLC foi de  $90,09 \pm 1,15\%$ , enquanto a capacidade de carga foi de cerca de 0,90%. O elevado valor de eficácia de

encapsulação confirma a solubilidade do ibuprofeno nos lípidos selecionados para a preparação dos NLC, confirmando também que a composição da formulação e todos os parâmetros do processo de preparação favoreceram a encapsulação do ibuprofeno [276,316,344]. Mendes *et al.* (2013) [319] utilizaram nos seus estudos a mesma quantidade e a mesma proporção de lípido sólido e lípido líquido, o mesmo método de preparação dos NLC veiculando o miconazol e as mesmas variáveis (rotações por minuto, duração e amplitudes de sonicação) tendo obtido uma eficácia de encapsulação superior a 87%. Por outro lado, Li *et al.* (2008) [317] utilizaram nos seus estudos o mesmo lípido sólido e o mesmo lípido líquido para preparar, através do método fusão-ultrasonicação, os NLC veiculando o ibuprofeno, obtendo também valores de eficácia de encapsulação superiores a 90%. Gonzalez-Mira *et al.* (2010) [279] utilizaram o mesmo método de preparação dos NLC veiculando o flurbiprofeno obtendo uma EE superior a 92%. Conclui-se assim, que os resultados obtidos neste estudo estão em linha com os resultados obtidos por outros autores que utilizaram o mesmo método de preparação dos NLC.

#### 4.3.2.8 Análise térmica por calorimetria diferencial de varrimento (DSC)

Uma das melhores estratégias para estudar a solubilidade e a compatibilidade entre os lípidos selecionados e o fármaco é através da técnica de calorimetria diferencial de varrimento [281,307]. A Figura 46 demonstra os termogramas das matérias-primas a granel, das misturas físicas da mistura lipídica com o fármaco e das dispersões coloidais.



**Figura 46.** Perfis de análise térmica por DSC: **(A)** Termogramas do ibuprofeno, do lípido sólido, do polímero PF 127 e da mistura física da matriz lipídica com o ibuprofeno. **(B)** Termogramas da dispersão de NLC placebo (NLC<sub>p</sub>), da dispersão de NLC com IBU (NLC<sub>i</sub>), da dispersão de NLC sem ibuprofeno mas com PF 127 15% (m/m) (NLC<sub>p</sub>-PF 127 15%) e da dispersão NLC com ibuprofeno mas com PF 127 15% (m/m) (NLC<sub>i</sub>-PF 127 15%).

O termograma do lípido sólido Compritol® ATO 888 apresentou um pico endotérmico com uma temperatura *onset* de 70,1°C e uma temperatura de fusão de 72,4°C, enquanto o termograma do ibuprofeno apresentou um pico endotérmico único com uma temperatura *onset* de 74,3°C e uma temperatura de fusão de 77,6°C, estando de acordo com as fichas técnicas. O termograma da mistura física dos lípidos selecionados com o ibuprofeno COMP:IBU mostrou um pico endotérmico único com uma temperatura de fusão de 72,2°C, sem se ter registado qualquer evento térmico na zona de fusão do ibuprofeno. A diminuição da temperatura de fusão que se verificou na mistura

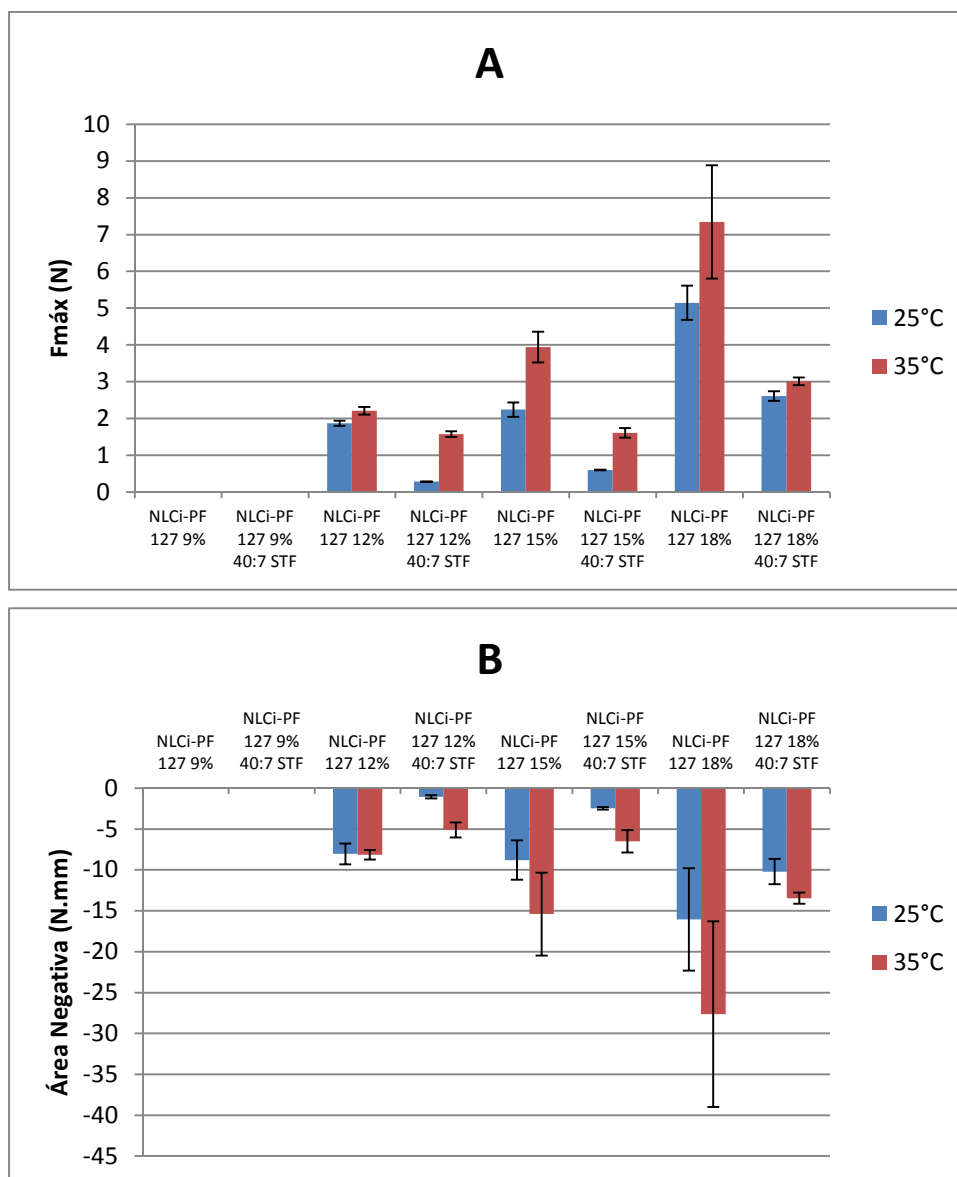
física COMP:IBU quando comparada com a temperatura de fusão do lípido sólido a granel e o facto de não se ter registado qualquer evento térmico na zona de fusão do ibuprofeno no termograma da mistura física reflete a solubilidade e a interação favorável entre o lípido e o ibuprofeno [271,319,395,396]. De acordo com estes resultados, conclui-se que os NLC podem ser preparados com estes lípidos.

Como pode ser verificado na Figura 46, as temperaturas de fusão das diferentes dispersões coloidais com e sem adição de PF 127 foram superiores à temperatura corporal. Este tipo de comportamento assegura que as NLC se mantêm no estado sólido após a sua administração, evitando a presença de *supercooled melts* (temperaturas de fusão das diferentes dispersões coloidais: NLC<sub>p</sub>- 62,6°C; NLC<sub>i</sub>- 62,5°C; NLC<sub>p</sub>-PF 127 15%- 62,8°C; NLC<sub>i</sub>-PF 127 15%- 62,5°C) [279,395]. Como era de esperar, os termogramas das dispersões coloidais com ibuprofeno (NLC<sub>i</sub> e NLC<sub>i</sub>-PF 127 15% (m/m)) não mostraram nenhum evento térmico na zona de fusão do ibuprofeno, o que sugere que o ibuprofeno se encontra solubilizado e encapsulado na matriz lipídica [281,307,319,344].

#### 4.3.2.9 Análise dos parâmetros de textura antes e após a diluição em fluido lacrimal artificial

A Figura 47 mostra os resultados dos parâmetros de textura das dispersões coloidais NLC<sub>i</sub>-PF 127 com diferentes percentagens de polímero termossensível com e sem diluição em fluido lacrimal artificial, avaliados às temperaturas de 25±2°C e 35±2°C.





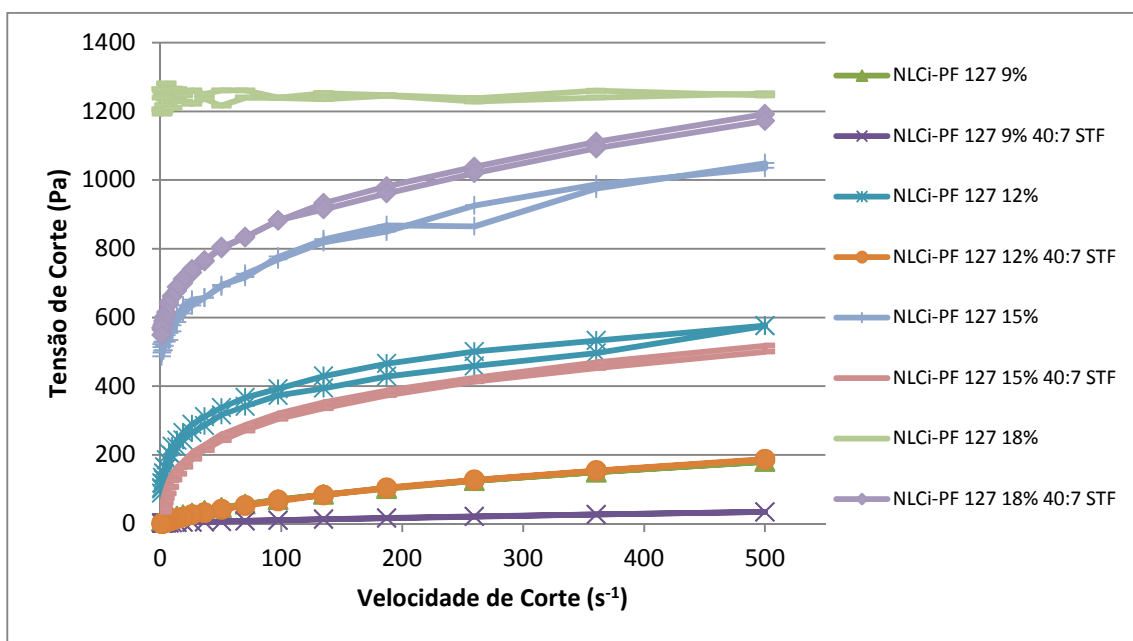
**Figura 47.** Firmeza (Fmáx.) **(A)** e Adesividade (Área Negativa) **(B)** da dispersão NLC<sub>i</sub>-PF 127 com diferentes concentrações de polímero termossensível com e sem diluição em STF à temperatura de 25±2°C e 35±2°C (Média ± DP, n=3).

Como se pode ver na Figura 47, no caso da formulação NLC<sub>i</sub>-PF 127 9% (m/m) não foi possível avaliar a firmeza e a adesividade, independentemente da temperatura de ensaio utilizada. Da análise desses parâmetros nas restantes formulações verificou-se que, como seria de esperar, o aumento da percentagem de polímero termossensível PF 127 na dispersão de NLC<sub>i</sub> provocou um aumento muito significativo dos valores da firmeza e da adesividade. O aumento da temperatura de 25°C para 35°C também aumentou os valores de firmeza e adesividade, confirmando a natureza termossensível do polímero PF 127. O mesmo comportamento foi verificado por diferentes autores

[156,186]. Como seria de esperar, a diluição das dispersões coloidais no fluido lacrimal artificial provocou uma diminuição dos respectivos valores de firmeza e de adesividade.

#### 4.3.2.10 Análise reológica antes e após a diluição em fluido lacrimal artificial

A Figura 48 ilustra os reogramas das diferentes dispersões NLC<sub>i</sub>-PF 127 com e sem diluição em fluido lacrimal artificial na proporção de 40:7, realizados a 35±0,5°C.

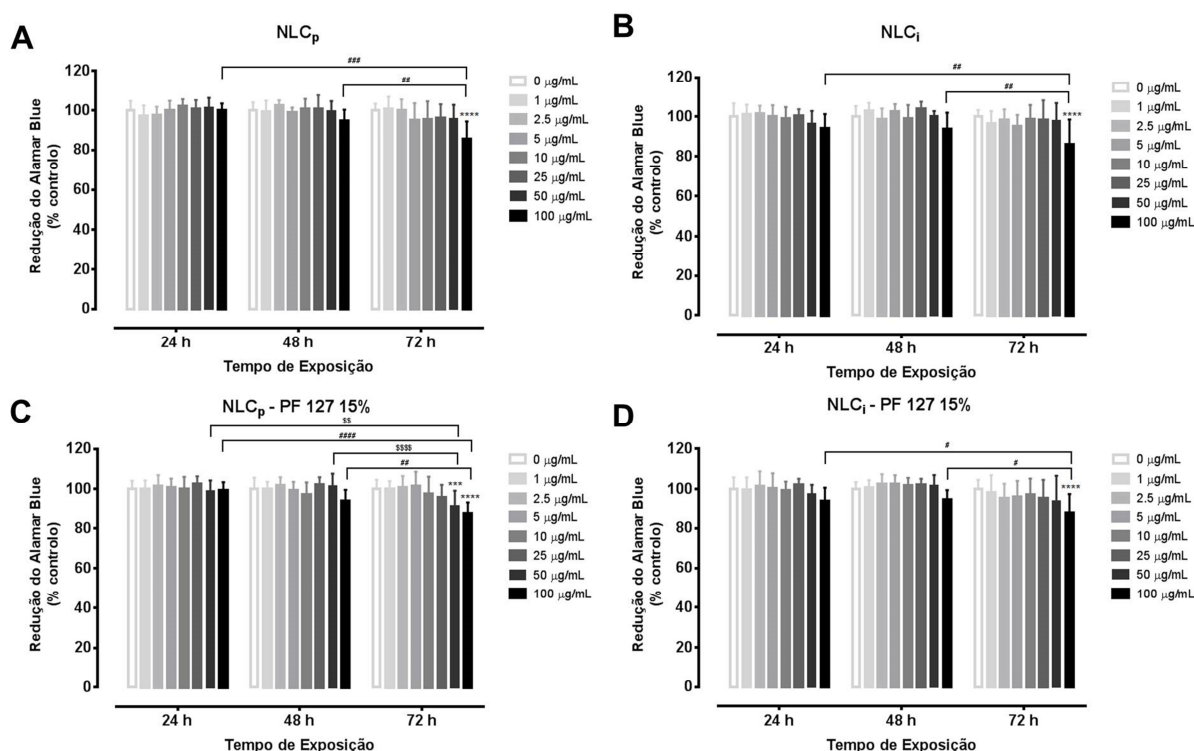


**Figura 48.** Reogramas das dispersões NLC<sub>i</sub>-PF 127 com diferentes percentagens de polímero termossensível com e sem diluição em STF a uma temperatura de 35±0,5°C.

A adição de um polímero termossensível, como o PF 127, à dispersão coloidal NLC<sub>i</sub> promoveu o aumento dos valores da viscosidade. As diferentes dispersões coloidais com diluição em fluido lacrimal artificial exibiram um comportamento não-Newtoniano pseudoplástico sem tixotropia. Já as formulações sem diluição apresentaram valor de cedência indicativo de um comportamento plástico, não tendo também apresentado tixotropia. A diminuição da viscosidade com o aumento da velocidade de corte é o comportamento ideal para as formulações oftálmicas, uma vez que este tipo de comportamento promove uma menor resistência ao movimento ocular e ao pestanejar [32,38]. Como era expectável, o aumento da concentração de PF 127 provocou um aumento da viscosidade das dispersões coloidais e a diluição das diferentes dispersões coloidais NLC<sub>i</sub>-PF 127 em fluido lacrimal artificial provocou uma diminuição dos valores da respetiva viscosidade.

#### 4.3.2.11 Estudos de biocompatibilidade: Ensaio da redução do Alamar Blue

Como se efetuaram muitas experiências independentes, aumentou-se muito o poder estatístico dos dados recolhidos e mesmo com diferenças tão pequenas, conseguimos que estas fossem estatisticamente diferentes. Como se pode verificar na Figura 49, embora tenha sido alcançada alguma significância estatística após 72 h de exposição para todas as formulações testadas na concentração de 100 µg/mL (e para a formulação NLC<sub>i</sub>-PF 127 a uma concentração de 50 µg/mL, depois de 72 h de exposição), todas as dispersões coloidais testadas demonstraram ser inócuas para as células Y-79, uma vez que a redução do Alamar Blue foi sempre superior a 85% [85,4%, 85,9%, 87,3% e 87,8% para uma concentração de 100 µg/mL das respetivas formulações, NLC<sub>p</sub>, NLC<sub>i</sub>, NLC<sub>p</sub>-PF 127 15% (m/m) e NLC<sub>i</sub>-PF 127 15% (m/m), e de 91,6% para uma concentração de 50 µg/mL da formulação NLC<sub>p</sub>-PF 127 15% (m/m), quando comparadas com o controlo (0 µg/mL)]. Apesar de termos obtido resultados estatisticamente diferentes entre as formulações ao fim das 72 h, estas foram consideradas inócuas para com as células Y-79. Conclui-se também que o efeito da adição das formulações na viabilidade celular foi dependente do tempo, apesar de não se terem registado alterações significativas nos outros pontos de estudo (24 e 48 h). Para feitos de toxicidade não se considera a existência de morte celular quando a viabilidade não desce abaixo dos 85%. Assim, os resultados deste estudo sugerem que as formulações oftálmicas desenvolvidas podem ser utilizadas com segurança na administração ocular de fármacos, não causando qualquer tipo de dano celular.



**Figura 49.** Efeito da adição das diferentes dispersões NLC na viabilidade celular. **(A)** NLC<sub>p</sub> – NLC placebo; **(B)** NLC<sub>i</sub> – NLC encapsulando o ibuprofeno; **(C)** NLC<sub>p</sub>-PF 127 15% - NLC placebo com PF 127 15% (m/m); **(D)** NLC<sub>i</sub>-PF 127 15% - NLC encapsulando o ibuprofeno com PF 127 15% (m/m). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  DP de 4 experiências independentes (sendo que cada experiência foi efetuada pelo menos em triplicado), e expressos como percentagem de redução do reagente Alamar Blue relativamente às células de controlo [redução do Alamar Blue (% do controlo)]. As comparações estatísticas entre os grupos foram efetuadas recorrendo ao Two-way ANOVA, seguido do *Bonferroni's multiple comparisons post hoc test* [\*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$  concentração vs. controlo (0  $\mu\text{g/mL}$ ); \$\$ $p < 0,01$ , \$\$\$\$ $p < 0,0001$  72 h vs. 48 h ou 24 h, para a concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ ; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , #####  $p < 0,0001$  72 h vs. 48 h ou 24 h, para a concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ ].

#### 4.3.2.12 Ensaio de liberação/dissolução *in vitro*

##### 4.3.2.12.1 Validação do método de doseamento do ibuprofeno em solução tampão fosfato pH 7,4

A validação do método de doseamento do ibuprofeno pode ser consultada no subcapítulo 4.3.2.7.1.

##### 4.3.2.12.2 Validação do método de doseamento do ibuprofeno em fluido lacrimal artificial (STF) pH 7,4

###### 4.3.2.12.2.1 Estudo da linearidade da resposta do detetor

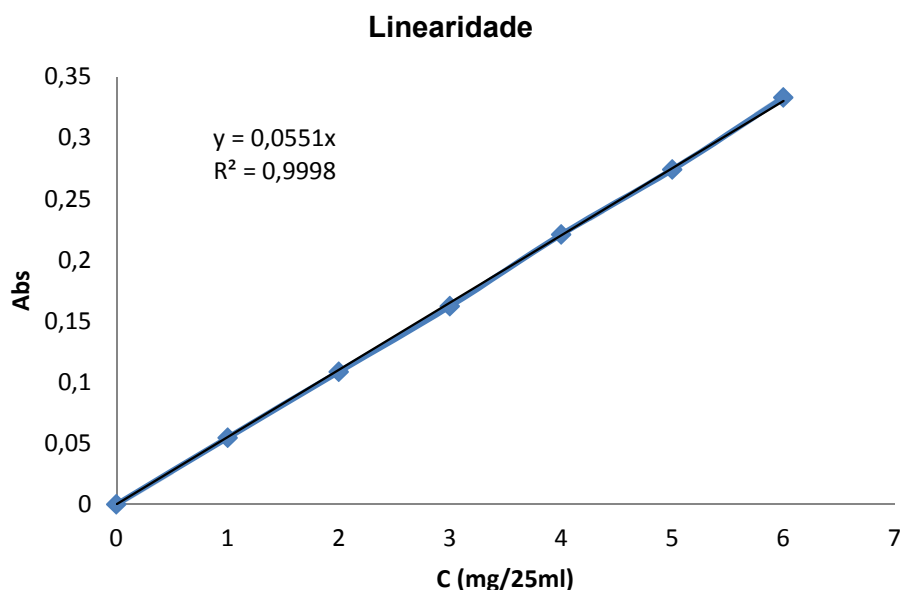
Antes de se proceder ao ensaio de liberação/dissolução *in vitro* do ibuprofeno foi efetuada a validação do método de doseamento. Desta forma, para efetuar o estudo da linearidade da resposta do detetor foram preparadas 6 soluções padrão de ibuprofeno em fluido lacrimal artificial (STF) pH 7,4 com as seguintes concentrações: 20% (1 mg/25 mL), 40% (2 mg/25 mL), 60% (3 mg/25 mL), 80% (4 mg/25 mL), 100% (5 mg/25 mL) e 120% (6 mg/25 mL).

Na Tabela XX apresentam-se os valores da absorvência obtidos para cada uma das concentrações padrão preparadas.

**Tabela XX.** Valores das absorvências lidas para o estudo de linearidade da resposta do detetor do método de doseamento espectrofotométrico do ibuprofeno.

C (%)	C (mg/25 mL)	Abs (272 nm)
0	0	0
20	1	0,0545
40	2	0,1085
60	3	0,1622
80	4	0,2209
100	5	0,2740
120	6	0,3330

A Figura 50 ilustra a representação gráfica dos valores das absorvências lidas em função das concentrações padrão de ibuprofeno.



**Figura 50.** Representação gráfica da reta de calibração relativa ao estudo da linearidade da resposta do detetor do método de doseamento espectrofotométrico do ibuprofeno.

A partir desta representação gráfica determinou-se o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), os valores da ordenada na origem e o declive da reta. O coeficiente de determinação foi de 0,9998, concluindo-se desta forma, que existe uma correlação linear entre as absorvências lidas e as diferentes soluções padrão de ibuprofeno.

#### 4.3.2.12.2 Estudo da precisão

Os estudos da precisão basearam-se na avaliação da repetibilidade e, para isso, procedeu-se à leitura da absorvência de 6 amostras da solução padrão de ibuprofeno com uma concentração de 100%, ou seja, 5 mg/25 mL. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela XXI.

**Tabela XXI.** Avaliação da repetibilidade do método de doseamento espectrofotométrico do ibuprofeno.

<b>Amostra</b>	<b>Valor de Abs lido</b>
1	0,2740
2	0,2754
3	0,2740
4	0,2738
5	0,2741
6	0,2746
<b>Média</b>	<b>0,2743</b>
<b>DP</b>	<b>0,0006</b>
<b>CV (%)</b>	<b>0,2168</b>

Este método apresentou um desvio padrão de 0,0006 e um coeficiente de variação de 0,2168. Como o coeficiente de variação é inferior a 2% concluiu-se que o método é preciso no que diz respeito à repetibilidade.

#### 4.3.2.12.2.3 Estudo da exatidão

Na Tabela XXII estão representados os resultados do estudo de exatidão.

**Tabela XXII.** Avaliação da exatidão do método de doseamento espectrofotométrico do ibuprofeno.

<b>Conc. teórica (mg/25 mL)</b>	<b>Abs. Lida</b>	<b>Conc. Lida (mg/25 mL)</b>	<b>Recuperação de Ibuprofeno (%)</b>
1	0,0545	0,99	98,91
2	0,1085	1,97	98,46
3	0,1622	2,94	98,12
4	0,2209	4,01	100,23
5	0,2740	4,97	99,46
6	0,3330	6,04	100,73
		<b>Média</b>	99,32
		<b>DP</b>	1,02
		<b>CV (%)</b>	1,02

Os valores da recuperação de ibuprofeno são muito próximos de 100%, sendo assim podemos concluir que o método é exato.

#### 4.3.2.12.2.4 Especificidade

Verificou-se que os restantes excipientes apresentaram absorvência a 272 nm. Desta forma, concluiu-se que este método não apresenta especificidade para o ibuprofeno quando incorporado nas formulações descritas.

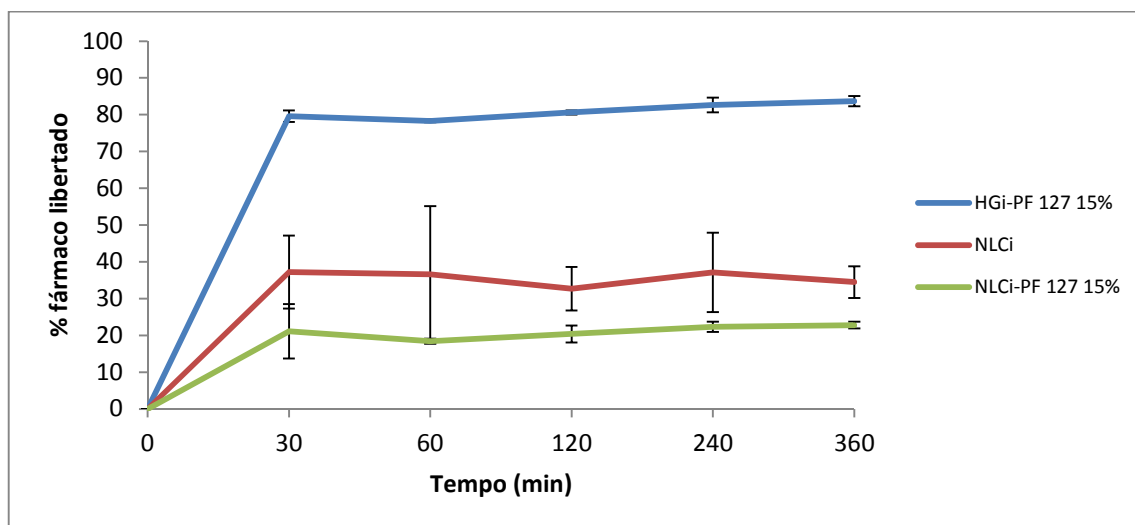
O método de doseamento espectrofotométrico do ibuprofeno cumpriu os requisitos da linearidade na gama de concentrações utilizadas, repetibilidade e exatidão. Dado que não cumpre o requisito da especificidade, é possível utilizar este método de uma forma fiável para o doseamento do ibuprofeno libertado/dissolvido nos meios de dissolução (solução tampão fosfato pH 7,4 ou STF pH 7,4), desde que sejam subtraídos os valores das absorvências dos excipientes que apresentam alguma absorvência no mesmo comprimento de onda.

#### 4.3.2.12.3 Resultados do ensaio de libertação/dissolução *in vitro*

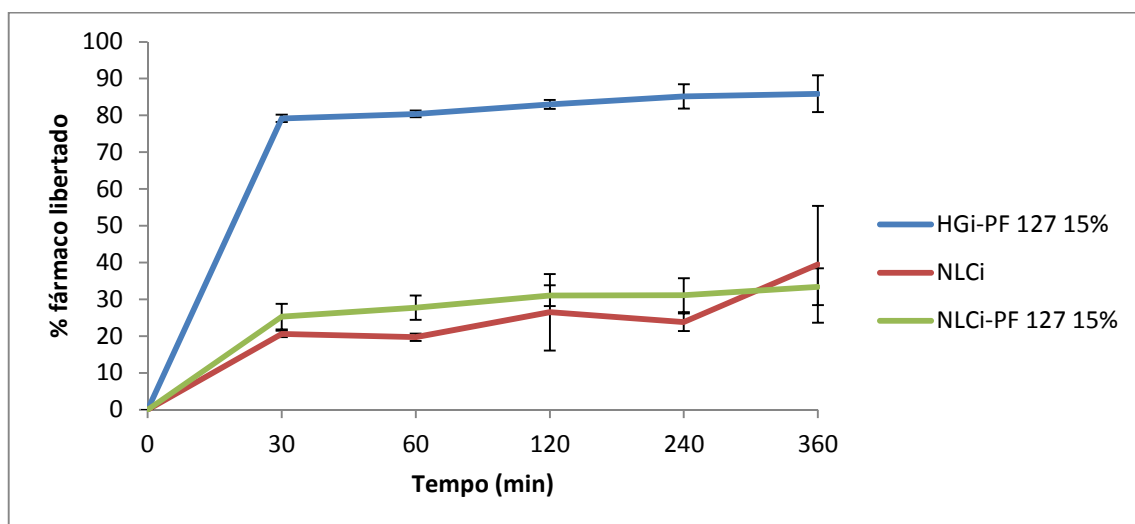
As Figuras 51 ilustram os estudos de libertação do ibuprofeno *in vitro* a partir do hidrogel PF 127 15% (m/m), NLC<sub>i</sub> e NLC<sub>i</sub>-PF 127 15% (m/m) usando como meios de dissolução a solução tampão fosfato pH 7,4 e o fluido lacrimal artificial pH 7,4.



(A)



(B)



**Figura 51.** Perfis de liberação *in vitro* do ibuprofeno a partir das formulações: HGi-PF 127 15% (m/m), NLC<sub>i</sub> e NLC<sub>i</sub>-PF 127 15% (m/m) em solução tampão fosfato a pH 7,4 **(A)** e em STF pH 7,4 **(B)**.

Como pode ser verificado na Figura 51, usando a solução tampão fosfato pH 7,4 como meio de dissolução, 30 minutos após o início do ensaio, 80% do ibuprofeno tinha sido libertado do hidrogel de PF 127 15% (m/m), sendo que após 6 horas de ensaio, aproximadamente 84% de ibuprofeno tinha sido libertado. Tal como esperado, o uso de transportadores coloidais como as nanopartículas lipídicas NLC promoveram uma liberação prolongada do ibuprofeno durante várias horas. Desta forma, após 30 minutos de ensaio, somente 37% de ibuprofeno tinha sido libertado da dispersão NLC<sub>i</sub>,

permanecendo este valor sem alterações significativas durante as 6 horas do estudo. Mendes *et al.* (2013) [319] nos seus estudos prepararam NLC recorrendo ao mesmo método de preparação e com a mesma quantidade e proporção de lípido sólido e lípido líquido, tendo obtido uma libertação prolongada do fármaco veiculado, sendo que na primeira meia hora de ensaio foi libertado apenas 8% de fármaco, tendo sido libertado somente 22% ao fim de 48 horas de ensaio. O mesmo tipo de perfil de libertação de fármaco a partir dos NLC foi descrito pelos autores Shen *et al.* (2010) [52] e Gongalez-Mira *et al.* (2012) [343]. Nestes estudos verificou-se igualmente uma libertação rápida de fármaco na primeira meia hora de ensaio, possivelmente, devido à existência de moléculas de fármaco adsorvidas à superfície dos NLC, sendo que depois se verificou uma libertação prolongada de fármaco, sugerindo que o fármaco se encontrava encapsulado no interior da matriz lipídica dos NLC [52,319,343]. Desta forma conclui-se que a libertação prolongada do ibuprofeno foi causada, não só, pela natureza lipídica das nanopartículas, como também devido à elevada eficácia de encapsulação das NLC desenvolvidas [52,274,316,319,344,392].

A adição do polímero PF 127 à dispersão coloidal poderá promover o aumento da eficácia do sistema desenvolvido, na medida que permite o prolongamento da libertação do ibuprofeno quando comparada com a dispersão coloidal sem polímero, uma vez que o fármaco terá também que difundir através da rede polimérica antes de ser libertado [186]. Silva *et al.* (2012) [274] e Mendes *et al.* (2013) [319] também reportaram este tipo de comportamento quando adicionaram um hidrogel a uma dispersão coloidal. A formulação NLC<sub>i</sub>-PF 127 15% (m/m), após 6 horas de ensaio, libertou apenas 22,8% de ibuprofeno para a solução tampão fosfato pH 7,4. Através do cálculo do factor de semelhança conclui-se que os perfis de dissolução do NLC<sub>i</sub> e do NLC<sub>i</sub>-PF 127 15% (m/m) em solução tampão fosfato pH 7,4 são diferentes ( $f_2=41,4$ ).

Usando o fluido lacrimal artificial pH 7,4 como meio de dissolução, a libertação do ibuprofeno de ambas as formulações (NLC<sub>i</sub> e NLC<sub>i</sub>-PF 127 15% (m/m)) não apresentou diferenças significativas ao fim das 6 horas do ensaio. Através do cálculo do factor de semelhança conclui-se que os perfis de dissolução do NLC<sub>i</sub> e do NLC<sub>i</sub>-PF 127 15% (m/m) em STF pH 7,4 são semelhantes ( $f_2=59,8$ ).

#### 4.4 Conclusões

Depois de comprovado por DSC que o lípido sólido (Compritol® ATO 888) utilizado solubiliza o ibuprofeno, procedeu-se à preparação dos NLC através da técnica da emulsificação seguida de ultrasonicação. Os NLC preparados apresentaram um tamanho médio inferior a 200 nm, um índice de polidispersão (PI) inferior a 0,3, um potencial zeta (ZP) próximo dos + 30 mV e uma eficácia de encapsulação de cerca de 90%. Com vista a aumentar a eficácia terapêutica desta dispersão coloidal foi adicionado um polímero termossensível, o PF 127, de modo a obter uma formulação oftálmica que pudesse ser administrada topicamente na forma líquida e que gelificasse somente ao entrar em contacto com a temperatura da superfície ocular. A otimização da quantidade de PF 127 a adicionar à dispersão coloidal é um passo fundamental, o qual deve ter em conta a diluição que a formulação sofre no fluido lacrimal existente a nível ocular. Assim, e com base nos estudos desenvolvidos anteriormente, adicionaram-se 15% (m/m) de PF 127, de forma a garantir que nas condições fisiológicas ocorresse a transição sol-gel da formulação oftálmica na superfície ocular. A adição de PF 127, a neutralização do pH e a adição do agente isotonzante (NaCl) à dispersão coloidal provocou uma diminuição do valor de potencial zeta (ZP), enquanto os outros parâmetros físicos-químicos não sofreram alterações significativas. De salientar que as características dos NLC com ou sem polímero termossensível mantiveram-se estáveis 90 dias após a sua produção. Os ensaios de biocompatibilidade realizados com a linha celular do retinoblastoma humano Y-79 baseado na redução do reagente Alamar Blue demonstraram que as formulações desenvolvidas não apresentaram toxicidade em concentrações entre 0 e 100 µg/mL, durante 72 horas. As formulações otimizadas demonstraram uma libertação prolongada do fármaco veiculado. A adição do PF 127 à dispersão coloidal provocou uma libertação mais prolongada do ibuprofeno comparativamente com a dispersão coloidal original.

Em suma, as nanopartículas lipídicas preparadas neste estudo demonstraram propriedades adequadas para a administração oftálmica do ibuprofeno.

## **5. Desenvolvimento, caracterização e estudos de biocompatibilidade de um colírio termossensível contendo Vetores Lipídicos Nanoestruturados (NLC) para a libertação prolongada do ibuprofeno**

### **5.1 Introdução**

O trabalho experimental descrito neste capítulo baseia-se no capítulo anterior, mas alterando o lípido sólido utilizado na preparação dos NLC. Neste caso foi utilizado o Precirol® ATO 5 como lípido sólido.

Antes da preparação das nanopartículas, e com o objetivo de obter NLC com uma elevada eficácia de encapsulação, selecionou-se um lípido sólido e um lípido líquido. Com recurso à técnica de calorimetria diferencial de varrimento (DSC) pretendeu-se confirmar que os lípidos selecionados escolhidos eram capazes de solubilizar o ibuprofeno, não existindo qualquer incompatibilidade entre eles ou entre cada um deles e o ibuprofeno. Depois de preparados, os NLC foram caracterizados por DLS em termos de tamanho médio de partículas (Z-average), índice de polidispersão (PI) e potencial zeta (ZP). Em seguida foi avaliada a eficácia de encapsulação e a capacidade de carga dos NLC contendo ibuprofeno. Simulando as condições fisiológicas, não só de temperatura como também de diluição no fluido lacrimal, procedeu-se ao ajuste da quantidade de PF 127 necessária para que a formulação gelificasse quando em contacto com a superfície ocular, imediatamente após a sua administração. De seguida, procedeu-se à análise dos parâmetros de textura e à análise reológica das diferentes formulações simulando as condições fisiológicas.

Foi também avaliada a toxicidade dos sistemas desenvolvidos através da realização não só de ensaios de biocompatibilidade utilizando a linha celular de retinoblastoma humano Y-79 tendo por base a redução do reagente Alamar Blue, como também, através de ensaios *in vitro* de irritabilidade ocular através do ensaio de HET-CAM. Por fim, procedeu-se à realização de ensaios de libertação *in vitro* de forma a avaliar a libertação do ibuprofeno a partir das diferentes formulações ao longo do tempo.

### **5.2 Materiais e Métodos**

A lista de matérias-primas, reagentes e equipamentos utilizados nos ensaios descritos neste capítulo está indicada no capítulo 2. De igual modo, os métodos utilizados

neste capítulo (estudo de compatibilidade e solubilidade lipídica, determinação do pH e da osmolalidade, determinação da temperatura de transição de fase solução-gel, determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta, avaliação da estabilidade das dispersões lipídicas na presença de fluido lacrimal artificial, determinação da morfologia das nanopartículas por microscopia eletrônica de varrimento de alta resolução a baixa temperatura (cryoSEM), determinação da eficácia de encapsulação e da capacidade de carga das NLC, análise térmica por calorimetria diferencial de varrimento (DSC), análise dos parâmetros da textura antes e depois da diluição em fluido lacrimal artificial, análise reológica antes e depois da diluição em fluido lacrimal artificial, estudos de biocompatibilidade: ensaio da redução do Alamar Blue, ensaio *in vitro* da irritabilidade ocular: ensaio de HET-CAM e os ensaios de libertação/dissolução *in vitro*) foram realizados de acordo com as metodologias descritas no capítulo 2.

### 5.3 Resultados e Discussão

#### 5.3.1 Estudo de compatibilidade e solubilidade lipídica

Os estudos de pré-formulação são uma etapa crítica, essencial para preparar formulações com propriedades físico-químicas adequadas e estáveis [281,346]. Desta forma, para obter nanopartículas lipídicas com tamanho de partícula adequado à administração oftálmica e com elevada eficácia de encapsulação do fármaco selecionado, é fundamental selecionar lípidos que sejam compatíveis entre si e que ambos solubilizem completamente o fármaco escolhido [52,271,273,276,278,279,310,314,316,317,319,321]. Assim, e de acordo com estudos científicos publicados previamente, foram selecionados dois lípidos sólidos (Precirol® ATO 5 e Gelucire® 44/14) e dois lípidos líquidos (Miglyol® 812 e Perhidrosqualeno) [271,317,307,319].

Para eliminar qualquer tipo de dúvida relativamente à solubilidade do ibuprofeno nos diferentes lípidos, a solubilidade lipídica foi testada com duas concentrações de ibuprofeno, ou seja, 0,1% e 1% (m/m). Os resultados dos ensaios da solubilidade lipídica demonstraram que o ibuprofeno era completamente solúvel nos dois lípidos sólidos, independentemente da concentração de fármaco utilizada.

O único lípido líquido que solubilizou o ibuprofeno foi o Miglyol® 812. A miscibilidade entre os lípidos sólidos e este lípido líquido foi avaliada em diferentes

proporções, nomeadamente, 90:10, 80:20 e 70:30 (m/m). A ausência de gotículas lipídicas no papel de filtro onde se procedeu ao espalhamento da mistura lipídica solidificada foi utilizada como indicador da miscibilidade entre os lípidos. Os resultados dos ensaios de miscibilidade entre lípidos indicaram que não foram detetadas gotículas lipídicas entre os diferentes lípidos testados, nas diferentes proporções. Assim, para a produção dos NLC, foi utilizada uma proporção lípido sólido:lípido líquido de 70:30 (m/m), uma vez que, de acordo com a literatura científica, o aumento da quantidade de lípido líquido utilizado na produção dos NLC, aumenta significativamente a eficácia de encapsulação do ibuprofeno [14,262].

### 5.3.2 Caracterização das dispersões coloidais de NLC

#### 5.3.2.1 Avaliação do aspeto físico

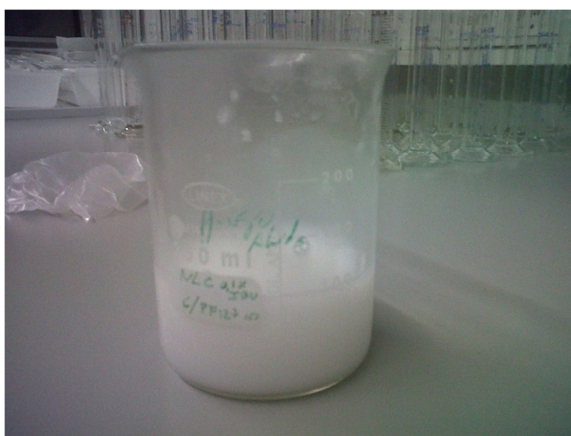
Todas as dispersões coloidais preparadas apresentaram um aspeto homogéneo, leitoso, de cor branca e sem qualquer tipo de separação de fases. A estabilidade e a miscibilidade das diferentes dispersões coloidais foram testadas com a adição do polímero termossensível PF 127. Estas formulações depois de preparadas foram colocadas no frigorífico a 4°C por um período de 30 dias, tendo sido avaliado o seu aspeto físico no fim desse período de tempo. As dispersões coloidais preparadas com o lípido sólido Gelucire® 44/14 demonstraram separação de fases, enquanto as dispersões coloidais preparadas com Precirol® ATO 5 apresentaram um aspeto estável e homogéneo. Assim, o lípido sólido escolhido para a preparação das dispersões coloidais foi o Precirol® ATO 5. O estudo prosseguiu com a preparação dos diferentes NLC com o lípido sólido Precirol® ATO 5 e com o lípido líquido Miglyol® 812.

De acordo com os resultados dos estudos de solubilidade lipídica e de acordo com os resultados do aspeto físico das dispersões coloidais preparadas com os dois lípidos sólidos, procedeu-se à preparação dos diferentes sistemas de acordo com a Tabela XXIII.

**Tabela XXIII.** Composição das diferentes dispersões NLC (P - Placebo; i - Ibuprofeno; NLC<sub>P</sub> - NLC placebo; NLC<sub>i</sub> – NLC encapsulando o ibuprofeno; NLC<sub>i</sub>-PF 127 n% – NLC encapsulando o ibuprofeno contendo diferentes percentagens (m/m) de polímero termossensível).

Composição (% m/m)	NLC <sub>P</sub>	NLC <sub>i</sub>	NLC <sub>i</sub> -PF 127 9%	NLC <sub>i</sub> -PF 127 12%	NLC <sub>i</sub> -PF 127 15%	NLC <sub>i</sub> -PF 127 18%
Precirol® ATO 5	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
Miglyol® 812	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Ibuprofeno	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Tween® 80	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Brometo de Cetiltrimetilamónio (CTAB)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
PF 127	-	-	9	12	15	18
Água Ultrapura	q.b.p. 100	q.b.p. 100	q.b.p. 100	q.b.p. 100	q.b.p. 100	q.b.p. 100

Vinte e quatro horas após a preparação dos diferentes NLC, procedeu-se à adição a frio do polímero termossensível, PF 127 nas percentagens seleccionadas [186]. As diferentes formulações preparadas foram armazenadas no frigorífico a 4°C.

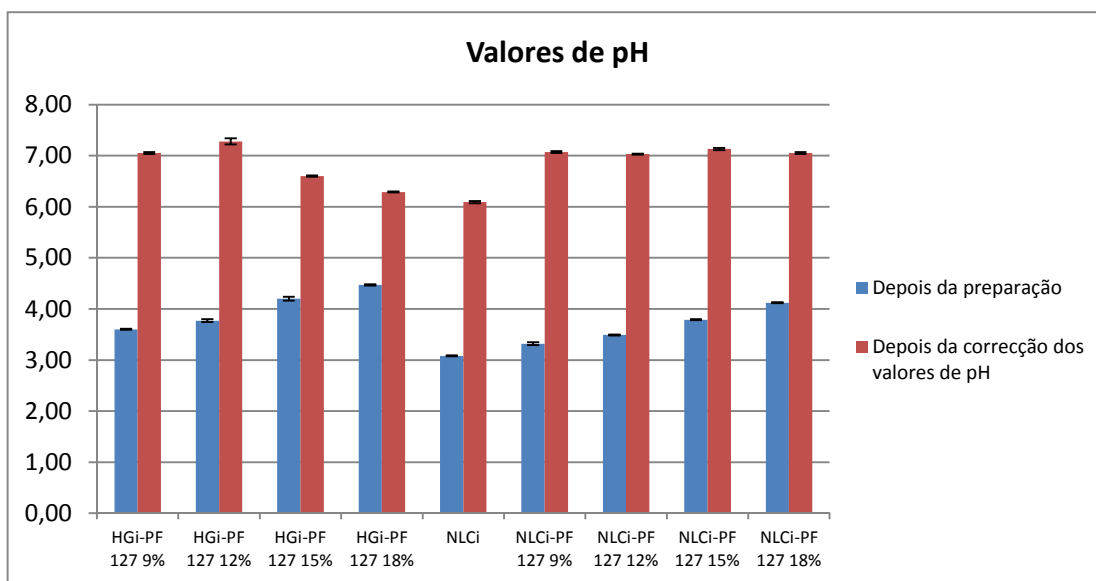


**Figura 52.** Aspeto final das dispersões coloidais após a adição do polímero termossensível PF 127.

Ao mesmo tempo, e através do designado método a frio, foram preparados hidrogéis com diferentes concentrações de PF 127, nomeadamente, 9,12,15 e 18% (m/m), tendo sido adicionado o ibuprofeno livre (não encapsulado em NLC) numa concentração de 0,1% (m/m) [71,153]. Os diferentes hidrogéis de PF 127 preparados foram armazenados no frigorífico a 4°C.

### 5.3.2.2 Determinação e correção do pH e da osmolalidade

Como é possível verificar na Figura 53, depois da preparação, os diferentes hidrogéis de PF 127 e as diferentes dispersões coloidais apresentaram valores de pH entre 3 e 5. Este resultado deve-se ao facto de o ibuprofeno ser um derivado do ácido propanóico, causando desta forma a diminuição do valor de pH das diferentes formulações. É possível verificar que a adição e o consequente aumento da percentagem de polímero PF 127 nas formulações, quer no caso dos hidrogéis, quer no caso das NLC, provoca um aumento do valor de pH em relação às formulações originais. Além disso, verifica-se também que os hidrogéis com NLC apresentam valores de pH mais baixos do que os hidrogéis contendo ibuprofeno livre. Este resultado pode ser devido à eventual presença de ácidos gordos livres na constituição dos lípidos utilizados na composição dos NLC.



**Figura 53.** Valores de pH dos diferentes hidrogéis e das dispersões NLC<sub>i</sub> preparadas com diferentes percentagens de PF 127, depois da sua preparação e depois do ajustamento do valor de pH (Média ± DP, n=3).

De forma a obter preparações oftálmicas com um valor de pH o mais próximo possível do valor do pH fisiológico, adicionou-se solução de NaOH 1 M a todas as formulações [14,356]. Este ajustamento no valor de pH é fundamental para que as formulações oftálmicas depois de administradas não causem qualquer tipo de irritação ocular, desconforto ou lacrimação. De acordo com diferentes autores, os tecidos oculares



toleram a administração de formulações oculares com valores de pH situados entre 4,0 e 8,5 [52,278,356-358]. Após a correção do valor de pH com a adição da quantidade necessária de solução de NaOH 1 M, todas as formulações apresentaram valores de pH entre os 6,1 e os 7,3. A isotonia das diferentes formulações oftálmicas foi conseguida com a adição de aproximadamente 0,7% (m/m) de NaCl.

#### 5.3.2.3 Determinação da temperatura de transição de fase solução-gel

É possível verificar em diferentes artigos científicos que a utilização de nanotransportadores coloidais, como sejam as nanopartículas, aumentam a biodisponibilidade e por consequência a eficácia terapêutica das formulações oftálmicas, devido essencialmente às propriedades bioadesivas e à capacidade destas formulações ultrapassarem as barreiras fisiológicas [26,27,32,39,283]. Apesar disto, é sabido que as dispersões coloidais apresentam uma baixa viscosidade, e por essa razão grande parte das formulações oftálmicas são facilmente eliminadas pelos mecanismos de defesa do globo ocular [14,274,344]. Como referido anteriormente, uma possível estratégia para ultrapassar a eliminação prematura das formulações oculares é através do aumento da viscosidade, aumentando desta forma o tempo de residência pré-corneal [11,14,39,45,46,344].

Com o intuito de aumentar o tempo de residência da formulação nos tecidos oculares, procedeu-se à adição de PF 127, à dispersão coloidal. Este polímero apresenta como principal característica o facto de apresentar uma temperatura de transição sol-gel próximo da temperatura corporal, aumentando a viscosidade da formulação somente acima desta temperatura. Assim, a temperatura de transição de sol-gel deve ser ajustada para que esta ocorra a uma temperatura ligeiramente inferior à temperatura dos tecidos oculares, ou seja, 35°C [344]. Deve ser tido em conta que, após a administração da formulação oftálmica, verifica-se uma diluição desta no fluido lacrimal. A otimização da concentração de PF 127 a ser adicionada às dispersões coloidais deve ter em conta não só a temperatura da superfície ocular mas também a diluição da formulação no fluido lacrimal.

Nos hidrogéis de PF 127, só na presença de uma concentração de polímero termossensível de 18% (m/m) verificou-se uma temperatura de transição sol-gel inferior a 35°C. Assim, esta formulação sem diluição em fluido lacrimal apresentou uma temperatura de transição sol-gel de  $22,3 \pm 0,6^\circ\text{C}$ , enquanto a mesma formulação com diluição em fluido lacrimal na proporção de 40:7 apresentou uma temperatura de

transição sol-gel de  $23,3 \pm 0,6^\circ\text{C}$ . Todos os outros hidrogéis de PF 127 apresentaram temperaturas de transição sol-gel superiores a  $50^\circ\text{C}$ .

Como se pode verificar na Tabela XXIV, as dispersões coloidais NLC<sub>i</sub>-PF127 preparadas com 12, 15 e 18 % (m/m) de polímero termossensível, sem diluição em fluido lacrimal artificial, apresentaram uma temperatura de transição sol-gel abaixo de  $35^\circ\text{C}$ .

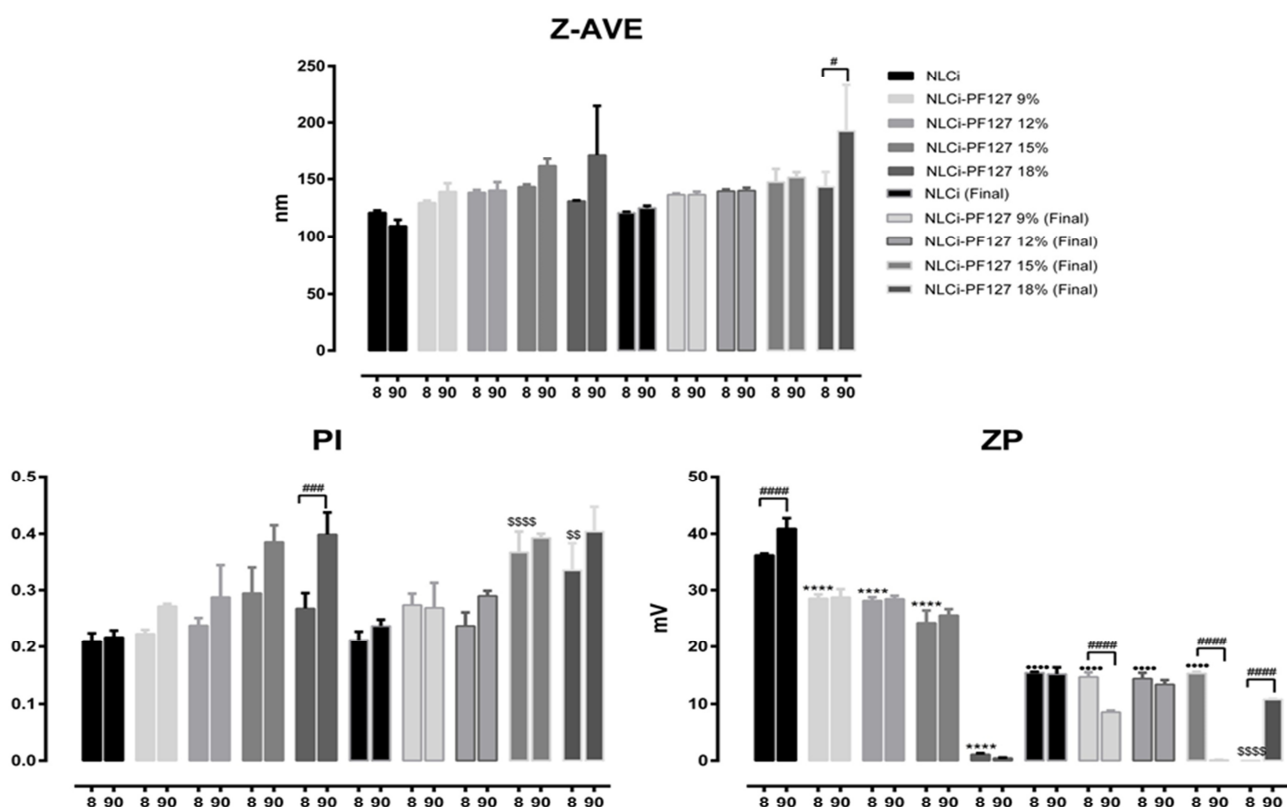
**Tabela XXIV.** Temperaturas de transição sol-gel das diferentes dispersões NLC<sub>i</sub> preparadas com diferentes concentrações de PF 127 (Média  $\pm$  DP, n=3).

	NLC <sub>i</sub> -PF 127 9%	NLC <sub>i</sub> -PF 127 12%	NLC <sub>i</sub> -PF 127 15%	NLC <sub>i</sub> -PF 127 18%
<b>Formulação original (<math>^\circ\text{C}</math>)</b>	> 50,0	$25,3 \pm 1,5$	$22,3 \pm 0,6$	$15,3 \pm 0,6$
<b>Depois da diluição em STF (<math>^\circ\text{C}</math>)</b>	> 50,0	> 50,0	$29,7 \pm 0,6$	$20,0 \pm 1,0$

Como esperado, o aumento da concentração do polímero PF 127 na dispersão coloidal provocou uma diminuição da temperatura de transição sol-gel. À temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ), as dispersões coloidais preparadas com 15 e 18% (m/m) encontram-se no estado semissólido, sendo que para uma administração oftálmica correta e adequada, estas formulações devem ser guardadas no frigorífico a  $4^\circ\text{C}$ . Após a diluição das diferentes dispersões coloidais NLC<sub>i</sub>-PF127 em fluido lacrimal na proporção de 40:7 verifica-se que somente as formulações com uma concentração do polímero termossensível de 15 e 18% (m/m) apresentam uma temperatura de transição sol-gel inferior a  $35^\circ\text{C}$ , mas somente a formulação com 15% (m/m) de PF 127 apresenta uma temperatura de transição sol-gel superior a  $25^\circ\text{C}$ . Por esta razão, e por ser a formulação com menor concentração de PF 127, somente a formulação NLC<sub>i</sub>-PF127 15% (m/m) foi utilizada nos ensaios seguintes.

#### 5.3.2.4 Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta

Os resultados do tamanho de partícula expressos como Z-ave, índice de polidispersão (PI) e potencial zeta (ZP) das diferentes dispersões coloidais estão resumidos na Figura 54. Estas determinações foram realizadas por DLS (dispersão dinâmica da luz).



Formulação/ Parâmetros	8 dias após a produção e armazenadas a 4°C			90 dias após a produção e armazenadas a 4°C		
	Z-Ave (nm)	PI	ZP (mV)	Z-Ave (nm)	PI	ZP (mV)
NLC <sub>i</sub>	121,0 ± 1,9	0,210 ± 0,014	36,33 ± 0,25	109,4 ± 5,4	0,217 ± 0,012	40,93 ± 1,79
NLC <sub>i</sub> -PF127 9%	129,6 ± 1,8	0,223 ± 0,007	28,57 ± 0,70	139,2 ± 7,2	0,272 ± 0,004	28,77 ± 1,42
NLC <sub>i</sub> -PF127 12%	138,4 ± 2,2	0,238 ± 0,013	28,17 ± 0,60	140,3 ± 7,1	0,288 ± 0,056	28,47 ± 0,55
NLC <sub>i</sub> -PF127 15%	143,4 ± 2,0	0,295 ± 0,045	24,25 ± 2,19	161,5 ± 6,3	0,386 ± 0,029	25,60 ± 1,08
NLC <sub>i</sub> -PF127 18%	131,0 ± 0,6	0,268 ± 0,027	1,10 ± 0,19	171,6 ± 43,0	0,399 ± 0,038	0,45 ± 0,08
NLC <sub>i</sub> (Final)	120,8 ± 1,0	0,212 ± 0,015	15,43 ± 0,15	125,0 ± 2,0	0,237 ± 0,011	15,20 ± 1,15
NLC <sub>i</sub> -PF127 9% (Final)	136,6 ± 0,9	0,274 ± 0,020	14,70 ± 0,80	136,5 ± 2,7	0,269 ± 0,044	8,58 ± 0,26
NLC <sub>i</sub> -PF127 12% (Final)	139,6 ± 1,4	0,237 ± 0,024	14,40 ± 1,01	140,0 ± 2,5	0,290 ± 0,009	13,40 ± 0,74
NLC <sub>i</sub> -PF127 15% (Final)	147,4 ± 11,4	0,368 ± 0,036	15,30 ± 0,26	151,5 ± 4,6	0,393 ± 0,007	0,11 ± 0,03
NLC <sub>i</sub> -PF127 18% (Final)	143,4 ± 12,8	0,335 ± 0,049	0,04 ± 0,02	192,7 ± 40,4	0,404 ± 0,043	10,80 ± 0,10

(Nota: Formulações Finais - formulações isotônicas com valor de pH neutro)

**Figura 54.** Valores de Z-ave, Índice de Polidispersão (PI) e Potencial Zeta (ZP) das diferentes dispersões NLC<sub>i</sub> medidos 8 e 90 dias após a sua preparação. Os diferentes resultados foram expressos como média ± DP, realizados em triplicado. As comparações estatísticas foram efetuadas recorrendo ao Two-way ANOVA, seguido do *Tukey's multiple comparisons test* [Z-ave - #p<0,05 8 dias vs. 90 dias; PI - \$\$p<0,01; \$\$\$\$p<0,0001

vs. NLC<sub>i</sub> (Final) 8 dias; ###p<0,001 8 dias vs. 90 dias; **ZP** - \*\*\*\* p<0,0001 vs. NLC<sub>i</sub> 8 dias; \$\$\$\$p<0,0001 vs. NLC<sub>i</sub> (Final) 8 dias; •••p<0,0001 Formulação 8 dias vs. Formulação (Final) 8 dias; #####p<0,0001 8 dias vs. 90 dias].

A técnica de preparação dos NLC por emulsificação seguida de ultrasonicação foi utilizada por diferentes autores, tendo sido obtidas nanopartículas lipídicas com excelentes propriedades físico-químicas [276,319,392]. Como se pode ver na Figura 54, recorrendo a esta técnica de preparação de nanopartículas lipídicas, também se obtiveram NLC com excelentes propriedades físico-químicas. Oito dias após a preparação dos diferentes NLC e antes de se proceder à neutralização do pH e de tornar as dispersões coloidais isotónicas, os NLC<sub>i</sub> apresentavam um Z-average de 120 nm, um índice de polidispersão (PI) inferior a 0,21 e um potencial zeta (ZP) de + 36 mV.

De acordo com os resultados do tamanho médio das partículas pode-se afirmar que as dispersões coloidais preparadas são adequadas para a administração oftálmica. Facilmente se constata que o diâmetro médio das nanopartículas das diferentes dispersões coloidais preparadas, mesmo depois da adição de diferentes percentagens (m/m) de polímero PF 127 foi sempre inferior a 200 nm, o que promove a mucoadesão e aumenta a adsorção e a penetração dos NLC através dos tecidos oculares. De facto, o olho humano tolera partículas com um diâmetro máximo de 10 µm [39,279,317]. Existem diferentes autores que referem que a utilização de nanopartículas com um tamanho situado entre 50 e 400 nm promove a mucoadesão e ajuda a superar as diferentes barreiras fisiológicas, aumentando assim a quantidade de fármaco que consegue atingir os alvos terapêuticos localizados no segmento posterior do globo ocular [32,39,45,46,81,267,272].

O valor do PI das diferentes formulações com e sem PF 127 foi sempre inferior a 0,3, exceto nas formulações NLC<sub>i</sub>-PF 127 15% (m/m) e NLC<sub>i</sub>-PF 127 18% (m/m) com o pH e a isotonia corrigidos para utilização oftálmica. De acordo com os valores de PI obtidos, as diferentes dispersões de NLC preparadas foram consideradas monodispersões, com uma população homogénea de nanopartículas, sem partículas de tamanho micrométrico e sem se verificarem fenómenos de agregação [39,272,314,319,392]. Pode afirmar-se que dispersões coloidais com estes valores de Z-ave e PI são suscetíveis de serem administradas por via oftálmica, evitando a irritação ocular e aumentando a penetração das formulações através dos tecidos oculares [26,27,272]. De um modo geral, verifica-se que a adição do polímero PF 127 à dispersão coloidal provocou o aumento do valor de PI. Gonzalez-Mira *et al.* (2012) [343] obtiveram o

mesmo resultado quando adicionaram um carbómero às dispersões de NLC veiculando flurbiprofeno.

O potencial zeta (ZP) é um parâmetro bastante importante uma vez que indica indiretamente a estabilidade física a longo prazo das dispersões coloidais, medindo a magnitude da repulsão/atração eletrostática entre as partículas [392,397]. Uma dispersão coloidal é considerada estável quando o valor de potencial zeta é superior a  $\pm 30$  mV, uma vez que a repulsão eletrostática entre as partículas com a mesma carga elétrica é suficientemente forte para evitar a agregação das partículas [174,271,314,318]. Dispersões coloidais com valores de potencial zeta entre  $\pm 10$  mV e  $\pm 30$  mV são consideradas com instabilidade incipiente, sendo que, dispersões coloidais com valores de potencial zeta inferior a  $\pm 10$  mV são consideradas instáveis com propensão para coagular ou flocular facilmente. Da análise que se pode efetuar aos resultados da Figura 54 constata-se que as diferentes dispersões coloidais preparadas apresentaram valores de potencial zeta (ZP) positivos. A adição do CTAB (brometo de cetiltrimetilamónio), um lípido catiónico, utilizado como conservante, teve como principal função conferir carga positiva aos NLC [281].

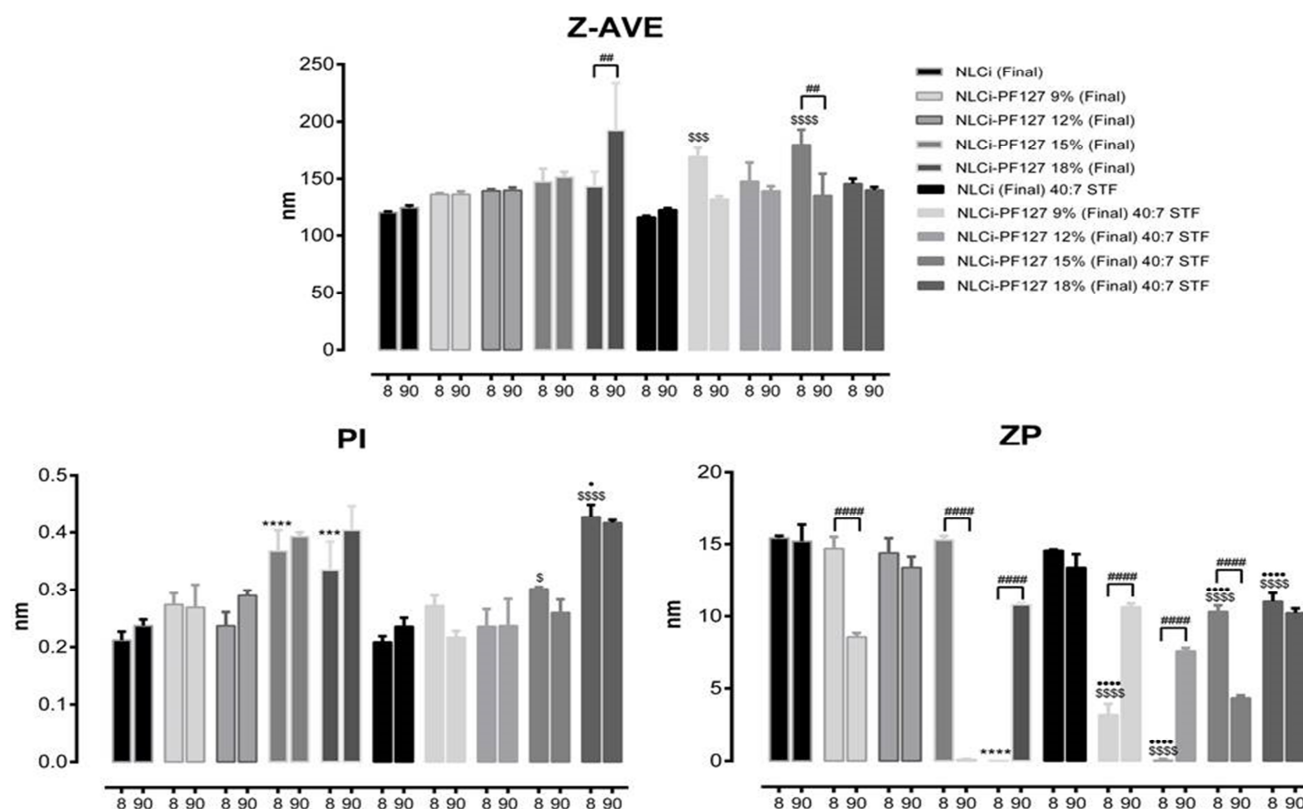
De realçar que os NLC com carga positiva podem estabelecer interações eletrostáticas com as cargas negativas existentes nos tecidos oculares, sendo estas cargas elétricas conferidas essencialmente pela mucina. A existência de interações eletrostáticas entre os NLC e a mucina existente na superfície ocular promove o aumento do tempo de residência pré-corneal da formulação oftálmica, aumentando assim a absorção e a penetração do fármaco veiculado [25,43,81,278,281]. A adição do polímero PF 127, um polímero não iónico baseado em sequências de PEO-PPO, causou uma diminuição dos valores do potencial zeta (ZP), independentemente das concentrações de polímero adicionado, uma vez que a rede polimérica fixa-se à superfície das nanopartículas lipídicas, cobrindo-a, ou mascarando-a, não permitindo a deteção da carga elétrica. Através da aplicação da análise de variância, verifica-se que a adição do polímero PF 127 em diferentes concentrações provocou uma diminuição estatisticamente significativa nos valores de ZP das diferentes dispersões coloidais.

A adição de NaOH 1 M com o objetivo de neutralizar o pH e a adição de NaCl de forma a tornar as formulações isotónicas também provocou uma diminuição no potencial zeta (ZP), concluindo-se através da aplicação da análise de variância que estas alterações são estatisticamente significativas. Este facto era esperado uma vez que a adição destes compostos pressupõe a adição de contra-íões às dispersões coloidais, provocando a neutralização da carga elétrica das nanopartículas.

A estabilidade das dispersões coloidais foi avaliada 90 dias após a sua produção. Durante este período de tempo, as formulações estiveram armazenadas no frigorífico a 4°C. Na generalidade, os resultados demonstraram que não se verificaram alterações significativas nos valores de Z-ave e de PI das diferentes dispersões coloidais. No que se refere ao valor do potencial zeta (ZP), através da aplicação da análise de variância, verificou-se que as alterações são estatisticamente significativas nas formulações finais com polímero à exceção da formulação com 12% (m/m) de PF 127. Conclui-se assim que após os 90 dias de armazenamento, as diferentes dispersões coloidais mantêm propriedades físico-químicas suscetíveis de serem aplicadas por via oftálmica sem causar desconforto ou irritação ocular. Este facto indica uma boa estabilidade dos NLC preparados, a qual se deve provavelmente à correta escolha do tensioativo (Tween® 80), indicando também que a quantidade deste excipiente utilizada na preparação dos NLC foi a mais correta [274,316,392].

#### 5.3.2.5 Avaliação da estabilidade das dispersões lipídicas na presença de fluido lacrimal artificial

Como se pode verificar na Figura 55, a diluição das diferentes dispersões coloidais em fluido lacrimal artificial na proporção de 40:7 não provocou alterações significativas nos valores de Z-ave e de PI. No entanto, a adição de fluido lacrimal artificial como forma de simular as condições fisiológicas provocou alterações estatisticamente significativas nos valores de ZP de todas as dispersões coloidais contendo polímero. Assim, a adição do STF às formulações contendo PF 127 em concentrações de 9, 12 e 15% (m/m) provocou uma diminuição do valor de ZP, enquanto a adição de STF provocou o aumento do valor de ZP na dispersão coloidal contendo 18% (m/m) de PF 127. Apesar disso, concluiu-se que, simulando as condições fisiológicas, mantém-se a integridade e as propriedades físico-químicas das dispersões coloidais com e sem PF 127. Assegurar a manutenção das propriedades físico-químicas das nanopartículas lipídicas, em condições fisiológicas, principalmente no que diz respeito ao tamanho e ao potencial zeta, é fundamental para se poder tirar partido das vantagens da utilização deste tipo de transportador coloidal, nomeadamente, no que se refere à interação com as glicoproteínas de carga negativa presentes na superfície ocular, à penetração através dos tecidos oculares até ao alvo terapêutico e à promoção da libertação modificada do fármaco veiculado.

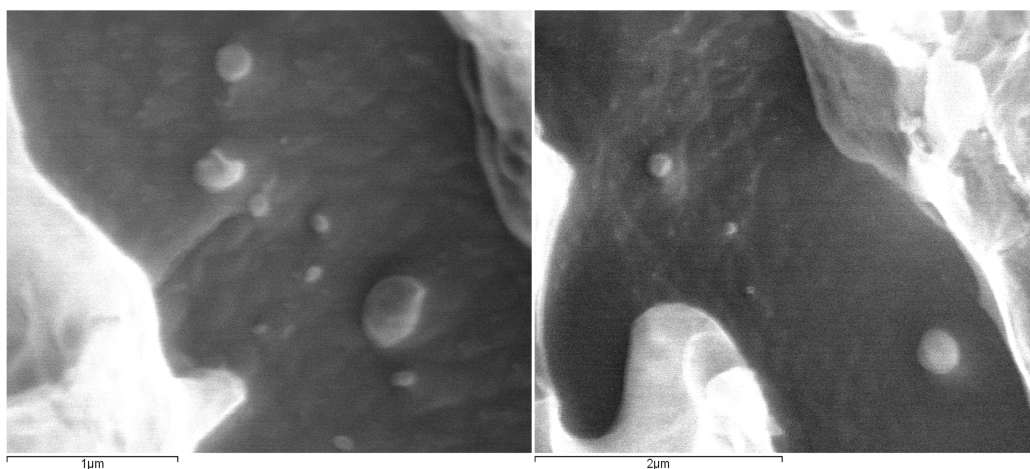


Formulação/ Parâmetros	8 dias após a produção e armazenadas a 4°C			90 dias após a produção e armazenadas a 4°C		
	Z-Ave (nm)	PI	ZP (mV)	Z-Ave (nm)	PI	ZP (mV)
NLC <sub>i</sub> (Final) 40:7 STF	116,8 ± 1,12	0,209 ± 0,010	14,57 ± 0,06	123,2 ± 1,4	0,236 ± 0,015	13,40 ± 0,92
NLC <sub>i</sub> -PF127 9% (Final) 40:7 STF	169,3 ± 8,12	0,272 ± 0,018	3,22 ± 0,73	132,3 ± 2,6	0,217 ± 0,011	10,63 ± 0,25
NLC <sub>i</sub> -PF127 12% (Final) 40:7 STF	147,9 ± 16,22	0,236 ± 0,030	0,04 ± 0,10	139,4 ± 4,3	0,237 ± 0,047	7,61 ± 0,21
NLC <sub>i</sub> -PF127 15% (Final) 40:7 STF	180,0 ± 13,15	0,302 ± 0,003	10,32 ± 0,43	135,5 ± 1,9	0,260 ± 0,023	4,36 ± 0,17
NLC <sub>i</sub> -PF127 18% (Final) 40:7 STF	145,8 ± 4,38	0,428 ± 0,021	11,03 ± 0,59	140,4 ± 2,5	0,417 ± 0,005	10,23 ± 0,31

**Figura 55.** Efeito da adição de fluido lacrimal artificial (STF) na proporção de 40:7 nos valores de Z-ave, Índice de Polidispersão (PI) e Potencial Zeta (ZP) das diferentes dispersões NLC<sub>i</sub> medidos 8 e 90 dias após a sua preparação. Os diferentes resultados foram expressos como média ± DP, realizados em triplicado. As comparações estatísticas foram efetuadas recorrendo ao Two-way ANOVA, seguido do *Tukey's multiple comparisons test* [**Z-ave** - \$\$\$p<0,001; \$\$\$\$p<0,0001 vs. NLC<sub>i</sub> (Final) 40:7 STF 8 dias; ##p<0,01 8 dias vs. 90 dias; **PI** - \*\*\*p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001 vs. NLC<sub>i</sub> (Final) 8 dias; \$p<0,05; \$\$\$\$p<0,0001 vs. NLC<sub>i</sub> (Final) 40:7 STF 8 dias; •p<0,05 Formulação (Final) 8 dias vs. Formulação (Final) 40:7 STF 8 dias; **ZP** - \*\*\*\* p<0,0001 vs. NLC<sub>i</sub> (Final) 8 dias; \$\$\$\$p<0,0001 vs. NLC<sub>i</sub> (Final) 40:7 STF 8 dias; •••p<0,0001 Formulação (Final) 8 dias vs. Formulação (Final) 40:7 STF 8 dias; #####p<0,0001 8 dias vs. 90 dias].

### 5.3.2.6 Determinação da morfologia das nanopartículas por microscopia eletrónica de varrimento de alta resolução a baixa temperatura (cryoSEM)

A morfologia da superfície e o tamanho médio dos NLC<sub>i</sub> foram observados utilizando a microscopia eletrónica de varrimento de alta resolução a baixa temperatura (cryoSEM) 8 dias após a sua preparação. Como se pode verificar na Figura 56, as imagens de cryoSEM demonstram que as NLC<sub>i</sub> preparadas são esféricas e sem fenómenos visíveis de agregação.



**Figura 56.** Imagens de CryoSEM das dispersões NLC<sub>i</sub> (ampliação de 40000x).

De realçar que não foi possível observar as dispersões coloidais nas quais foi adicionado o polímero termossensível PF 127. Este facto deve-se provavelmente à elevada quantidade de polímero adicionado às dispersões de NLC para promover a gelificação *in situ*, a qual forma uma densa rede polimérica, ocultando as nanopartículas lipídicas.

### 5.3.2.7 Determinação da eficácia de encapsulação e da capacidade de carga das NLC

#### 5.3.2.7.1 Validação do método de doseamento do ibuprofeno

A validação do método de doseamento do ibuprofeno pode ser consultado no subcapítulo 4.3.2.7.1.



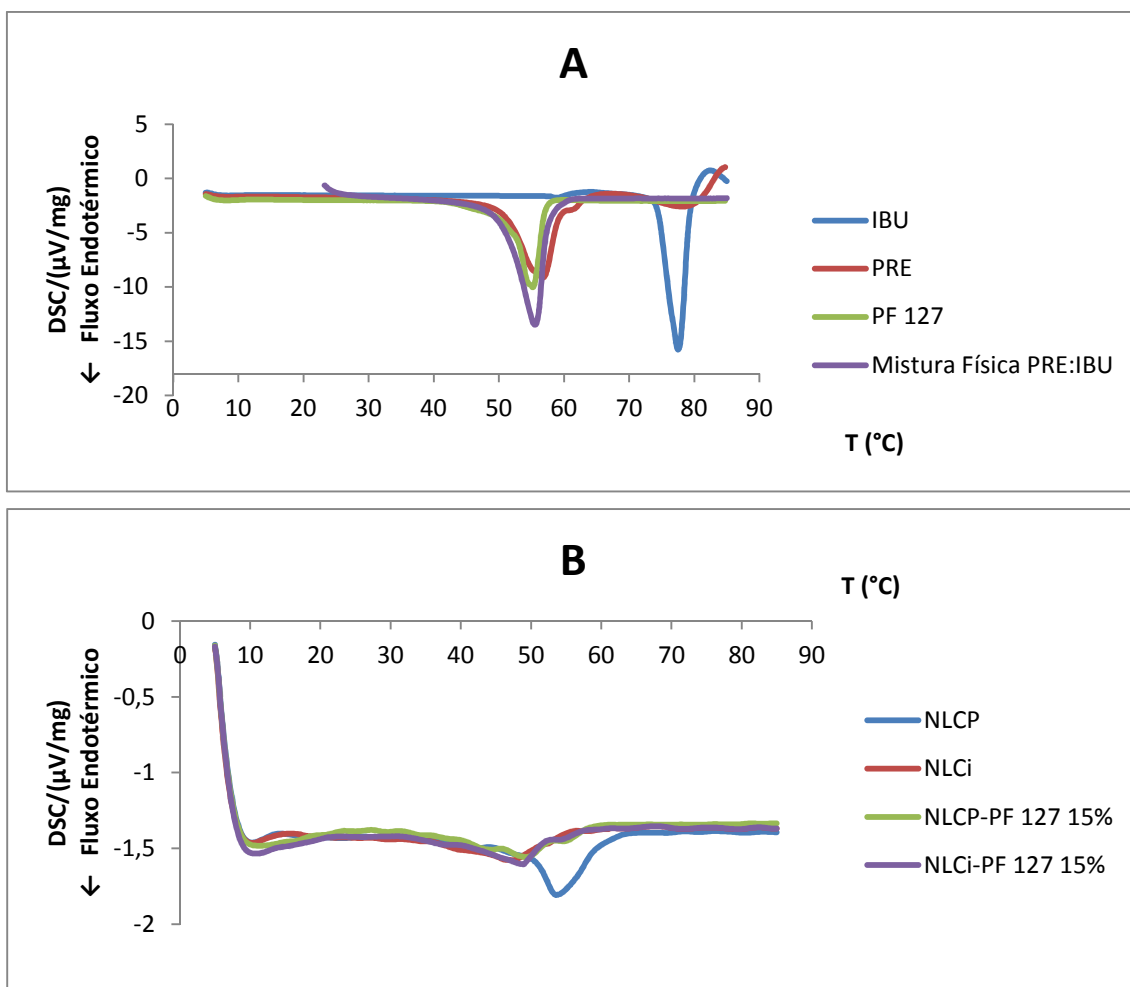
#### 5.3.2.7.2 Resultados da eficácia de encapsulação e da capacidade de carga dos NLC

A eficácia de encapsulação (EE) e a capacidade de carga (LC) dos NLC foi efetuada indiretamente, calculando a quantidade de ibuprofeno livre presente na fase aquosa das dispersões coloidais. Muitos autores, mesmo na presença de fármacos lipófilos, utilizam água como solvente, obtendo valores de eficácia de encapsulação e de capacidade de carga incorretos, uma vez que a água não solubiliza o fármaco não encapsulado presente na dispersão coloidal. Para efetuar este ensaio, selecionamos como solvente, a solução tampão fosfato pH 7,4, a qual esta descrita como tendo capacidade para solubilizar o ibuprofeno não encapsulado presente na fase aquosa da dispersão coloidal [186,394]. A eficácia de encapsulação dos NLC preparados neste trabalho foi de  $87,14 \pm 2,12\%$ , com uma capacidade de carga de  $0,87\%$ . Gonzalez-Mira *et al.* (2010) [279], Mendes *et al.* (2013) [319] e Hao *et al.* (2014) [344] utilizaram nos seus estudos o mesmo método de preparação dos NLC obtendo eficácias de encapsulação semelhantes. A obtenção de NLC com elevado valor de eficácia de encapsulação indica que os lípidos selecionados são compatíveis entre si, solubilizam o ibuprofeno, sendo que a composição da formulação e o processo de produção foram os mais apropriados, favorecendo a encapsulação deste fármaco [344].

#### 5.3.2.8 Análise térmica por calorimetria diferencial de varrimento (DSC)

A calorimetria diferencial de varrimento (DSC) é uma técnica que pode ser utilizada para fornecer informações sobre a estabilidade termodinâmica das dispersões coloidais [281]. Este tipo de estabilidade depende das modificações lipídicas que acontecem depois da cristalização, podendo ser determinada através da variação da temperatura e da energia na fase de transição [281,307].

De forma a demonstrar a solubilidade do fármaco na mistura lipídica usada na preparação das nanopartículas lipídicas foram realizadas análises de DSC às seguintes amostras: ibuprofeno a granel; lípido sólido a granel; mistura física da mistura lipídica com o ibuprofeno; e às diferentes dispersões coloidais com e sem ibuprofeno e também com e sem polímero termossensível. A Figura 57 ilustra os termogramas das análises de DSC das diferentes amostras testadas.



**Figura 57.** Perfis de análise térmica por DSC: **(A)** Termogramas do ibuprofeno, do lípido sólido, do PF 127 e da mistura física da matriz lipídica com o ibuprofeno. **(B)** Termogramas da dispersão de NLC sem ibuprofeno ( $NLC_p$ ), da dispersão de NLC com ibuprofeno ( $NLC_i$ ), da dispersão de NLC sem ibuprofeno e PF 127 15% (m/m) ( $NLC_p$ -PF127 15%) e da dispersão de NLC com ibuprofeno e PF 127 15% (m/m) ( $NLC_i$ -PF127 15%).

O termograma do lípido sólido a granel (Precirol<sup>®</sup> ATO 5) mostra um evento endotérmico com uma temperatura *onset* de 51,0 $^{\circ}C$  e uma temperatura de fusão de 56,8 $^{\circ}C$ , enquanto o termograma do ibuprofeno a granel apresenta um pico endotérmico único muito intenso, devido à forma cristalina do ibuprofeno, com uma temperatura *onset* de 74,3 $^{\circ}C$  e uma temperatura de fusão de 77,6 $^{\circ}C$ , o qual se encontra de acordo com a sua ficha técnica. O termograma da mistura física da mistura lipídica com o ibuprofeno mostrou um evento endotérmico único com um tempo de fusão de 55,5 $^{\circ}C$ , sem que exista qualquer evento térmico na zona ou intervalo de temperaturas de fusão do ibuprofeno. Como esperado, registou-se uma diminuição da temperatura de fusão do

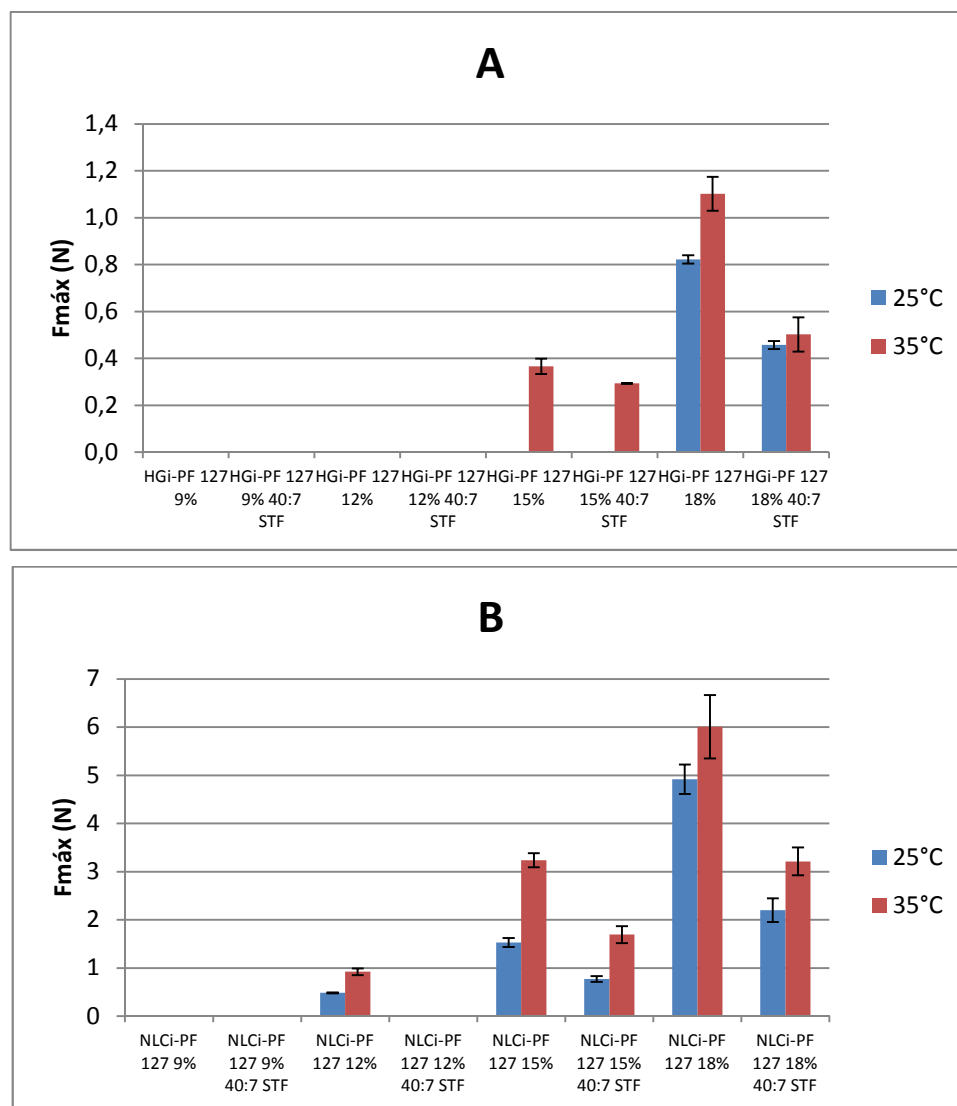
Precirol® ATO 5 (PRE) quando o ibuprofeno foi adicionado. Este facto sugere que se verifica uma interação entre o lípido utilizado e o ibuprofeno [271,319,395,396]. Esta redução seria tanto maior quanto maior a quantidade de fármaco utilizada. Este tipo de comportamento foi descrito por Silva *et al.* (2011) [276]. Desta forma conclui-se que as análises por DSC confirmam que o ibuprofeno foi solubilizado pela mistura lipídica, uma vez que não se registaram eventos de fusão do ibuprofeno no termograma da mistura PRE:IBU [276].

Como pode ver na Figura 57 (B) ocorreram mudanças significativas nos termogramas das dispersões coloidais quando comparados com os termogramas das matérias-primas. Araújo *et al.* (2010) [271] descreveram o mesmo comportamento, explicando essas diferenças, ou como uma consequência das interações entre a mistura lipídica e o tensioativo, ou devido ao tamanho das nanopartículas [271,398]. Um dos aspetos mais importantes é o facto das temperaturas de fusão das diferentes dispersões coloidais preparadas serem todas elas superiores a 40°C, nomeadamente, NLC<sub>p</sub>- 53,6°C; NLC<sub>i</sub>- 47,2°C; NLC<sub>p</sub>-PF 127 15% (m/m)- 49,1°C e NLC<sub>i</sub>-PF 127 15% (m/m)- 48,9°C. Uma vez que a temperatura de fusão dos diferentes NLC preparados é superior à temperatura corporal, garante-se que após a sua administração, estas nanopartículas lipídicas mantêm-se no estado sólido, prevenindo assim o aparecimento de *supercooled melts* [276,279,395]. Em suma, os termogramas das dispersões coloidais com e sem adição de polímero PF 127 exibem um pequeno evento endotérmico quando comparados com os termogramas do lípido sólido a granel ou da mistura PRE:IBU. Deve-se também realçar o facto de não ter sido detetado nenhum evento térmico na zona de fusão do ibuprofeno. Este facto indica que o ibuprofeno se encontrava no seu estado não cristalino e foi solubilizado na matriz lipídica amorfa dos diferentes NLC [281,307,319,344].

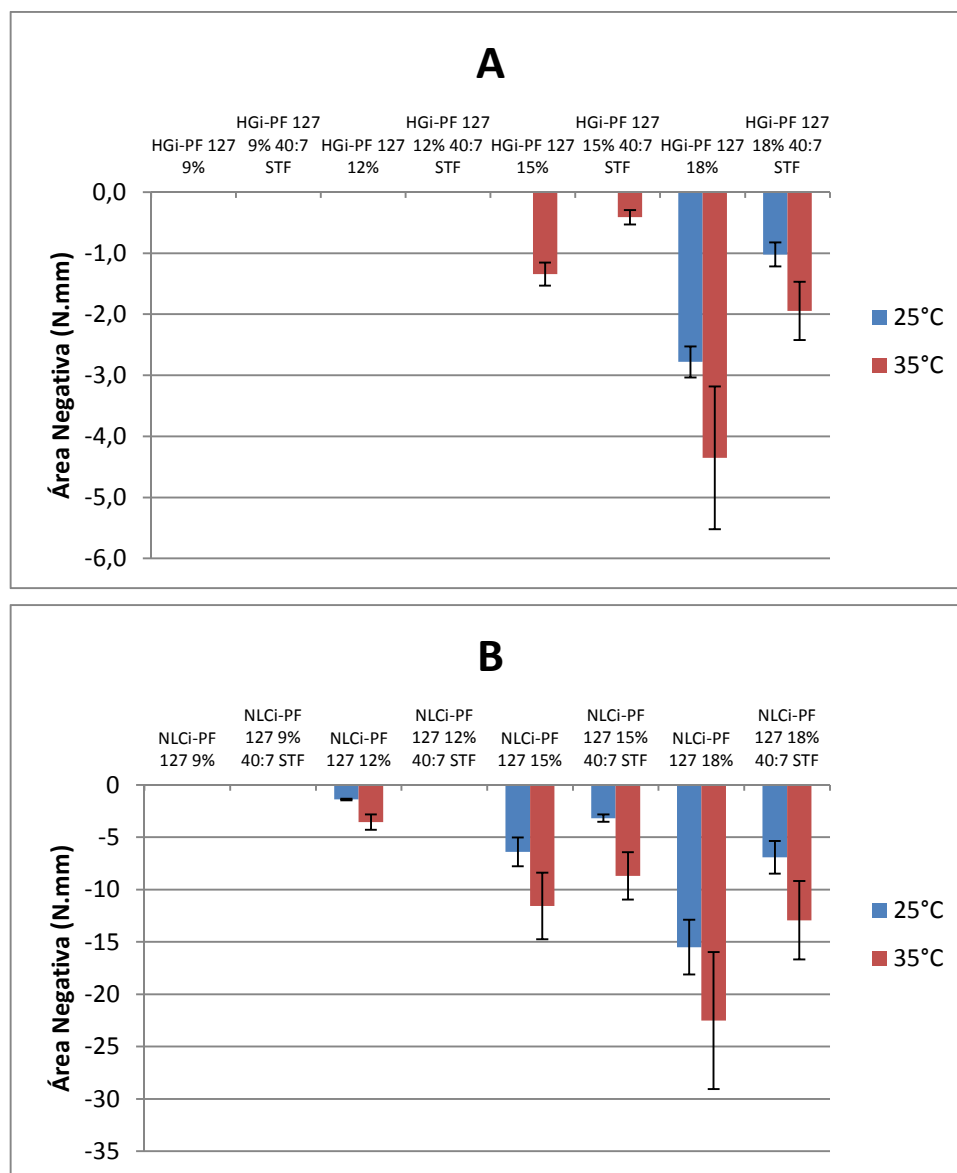
#### 5.3.2.9 Análise dos parâmetros de textura antes e após a diluição em fluido lacrimal artificial

As Figuras 58 e 59 mostram os resultados da avaliação dos parâmetros de textura dos hidrogéis de PF 127 e das dispersões coloidais NLC<sub>i</sub>-PF 127 preparadas com diferentes percentagens de polímero termossensível antes e depois de diluídos em fluido lacrimal artificial (STF), realizados a 25±2°C e a 35±2°C. De forma a aumentar a biodisponibilidade das dispersões coloidais, as formulações oftálmicas devem apresentar valores apropriados de firmeza, bioadesividade e viscosidade, com o objetivo primordial

de aumentar o tempo de residência pré-corneal, aumentando por consequência a eficácia terapêutica dos fármacos [14,303,304,344].



**Figura 58.** Firmeza (Fmáx.) dos hidrogéis de PF 127 **(A)** e das dispersões NLC<sub>i</sub>-PF 127 preparadas com diferentes percentagens de PF 127 **(B)** antes e depois da diluição em STF à temperatura de 25±2°C e de 35±2°C (Média ± DP, n=3).



**Figura 59.** Adesividade (Área Negativa) dos hidrogéis de PF 127 **(A)** e das dispersões NLC<sub>i</sub>-PF 127 preparadas com diferentes percentagens de PF 127 **(B)** antes e depois da diluição em STF à temperatura de 25±2°C e de 35±2°C (Média ± DP, n=3).

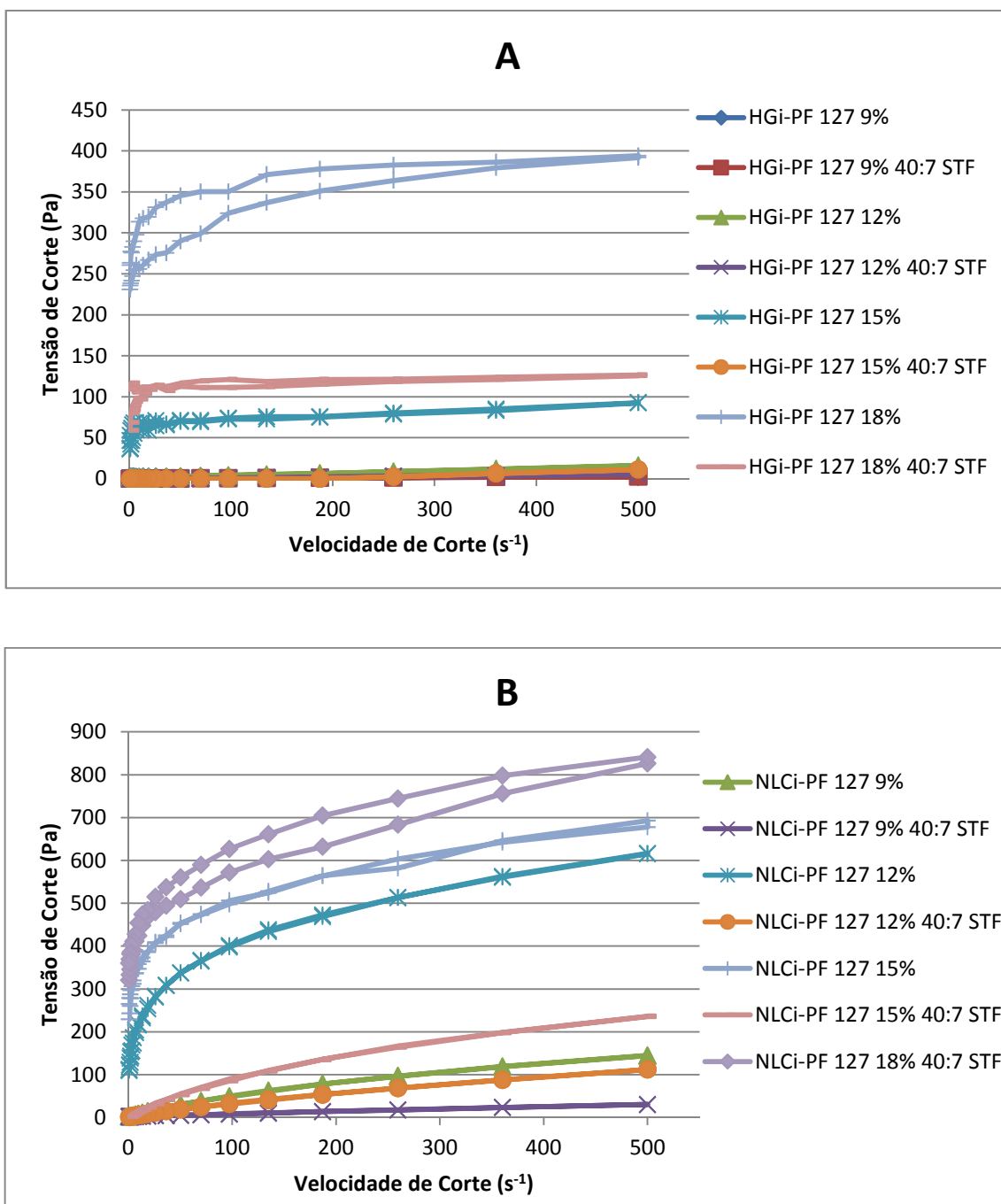
Com o objetivo de entender o efeito da incorporação do polímero termossensível PF 127 nas dispersões coloidais, foi efetuado um estudo comparativo entre os valores dos parâmetros de textura dos hidrogéis de PF-127 e das dispersões coloidais gelificadas com o mesmo polímero. Somente os hidrogéis com uma percentagem de PF 127 de 15 e 18% (m/m) exibiram valores de firmeza e adesividade, enquanto as dispersões coloidais gelificadas exibiram valores de firmeza e adesividade mensuráveis com concentrações de PF 127 de 12, 15 e 18% (m/m), independentemente da temperatura de ensaio. As dispersões coloidais NLC<sub>i</sub>-PF 127 com 15 e 18% (m/m) de polímero exibiram valores de

firmeza e de adesividade cerca de 5 a 6 vezes mais elevados do que os respectivos hidrogéis, com idênticas concentrações de polímero. Pela análise dos gráficos conclui-se (como seria de esperar) que a adição de quantidades crescentes de polímero PF 127 às dispersões coloidais aumentou consideravelmente os valores da firmeza e da adesividade destas formulações. A mesma conclusão foi reportada por Jones (1999) [122]. Além disso, comprovou-se que o aumento da temperatura de ensaio provocou um aumento dos valores da firmeza e da adesividade dos diferentes hidrogéis de PF 127 e das diferentes dispersões NLC<sub>i</sub>-PF 127. O mesmo comportamento foi descrito num outro estudo por Almeida *et al.* (2013) [186]. Aumentando a temperatura, ocorre a dessolvatação das cadeias hidrofílicas do polímero termossensível PF 127, uma vez que se verifica a quebra das pontes de hidrogénio existentes entre as cadeias hidrofílicas do polímero e o solvente, favorecendo desta forma as interações hidrofóbicas entre os domínios de PPO, causando a gelificação da rede polimérica [117,156,158,186].

Após a administração ocular de um colírio ocorre a diluição da formulação oftálmica no fluido lacrimal. Assim, deve-se garantir que a transição sol-gel do polímero ocorre a uma temperatura abaixo da temperatura da superfície ocular e ter em conta a diluição que a formulação oftálmica sofre no fluido lacrimal [14,15,39,40]. Desta forma, foram simuladas as condições fisiológicas, diluindo as diferentes formulações em fluido lacrimal artificial na proporção de 40:7. Independentemente da temperatura de ensaio, e como seria de esperar, a diluição das diferentes formulações em fluido lacrimal artificial na proporção de 40:7 causou uma ligeira diminuição dos valores da firmeza e da adesividade.

#### 5.3.2.10 Análise reológica antes e após a diluição em fluido lacrimal artificial

A Figura 60 ilustra os reogramas dos hidrogéis de PF 127 e das dispersões NLC<sub>i</sub>-PF127 gelificadas com diferentes percentagens de polímero termossensível antes e depois da diluição em fluido lacrimal artificial a uma temperatura de 35±0,5°C.



**Figura 60.** Reogramas dos hidrogéis de PF 127 **(A)** e das dispersões NLC<sub>i</sub>-PF 127 preparadas com diferentes percentagens de PF 127 **(B)** antes e depois da diluição em STF à temperatura de  $35 \pm 0,5^\circ C$ .

Os reogramas dos diferentes hidrogéis de PF 127 mostram um comportamento não-Newtoniano plástico sem tixotropia, à exceção do hidrogel preparado com 18% (m/m) que exibiu uma pequena área de histerese. Como seria de esperar, o aumento da concentração de polímero termossensível na preparação do hidrogel provocou um

aumento da viscosidade. O mesmo comportamento foi verificado por Lenaerts *et al.* (1987) [391] nos seus estudos, concluindo que a viscosidade dos hidrogéis de PF 127 aumenta com o aumento da concentração de polímero e com o aumento da temperatura de ensaio. No entanto, apenas de obtiveram valores de tensão de corte (para a máxima velocidade de corte) acima dos 50 Pa no caso dos hidrogéis com concentrações de PF 127 superiores a 15% (m/m).

Com o objetivo de compreender o efeito da adição do polímero termossensível PF 127 às dispersões coloidais de NLC, foi realizado um estudo comparativo entre os reogramas dos hidrogéis de PF 127 e das dispersões coloidais gelificadas (NLC<sub>i</sub>-PF 127). À exceção da NLC<sub>i</sub>-PF 127 9%, todas as dispersões coloidais NLC<sub>i</sub>-PF 127 apresentaram um comportamento não-Newtoniano plástico. O mesmo comportamento foi verificado por Gonzalez-Mira *et al.* (2012) [343], Silva *et al.* (2012) [274] e Mendes *et al.* (2013) [319], que nos seus estudos adicionaram diferentes polímeros às dispersões coloidais, com o objetivo de aumentar a viscosidade das formulações. Este tipo de comportamento é ideal para as formulações oftálmicas porque oferece menos resistência ao movimento do globo ocular e ao pestanejar, uma vez que a viscosidade das formulações diminui quando a velocidade de corte (correspondendo ao mecanismo de defesa do olho) aumenta [32,38]. Somente a formulação NLC<sub>i</sub>-PF 127 18% (m/m) com diluição em fluido lacrimal exibiu uma ligeira tixotropia.

Verificou-se que, de um modo geral, as dispersões NLC<sub>i</sub>-PF 127 apresentaram uma viscosidade superior à dos respetivos hidrogéis, apresentando valores de tensão de corte máximos superiores a 600 Pa. De realçar que devido ao excesso de viscosidade não foi possível realizar o ensaio no caso da formulação NLC<sub>i</sub>-PF 127 18% (m/m) sem diluição. Após diluição em fluido lacrimal, as mesmas formulações apresentaram valores de tensão de corte (para a máxima velocidade de corte) inferiores a 300 Pa.

Tal como aconteceu nos ensaios da textura, o aumento da concentração de PF 127 nas formulações traduziu-se num aumento da viscosidade das dispersões coloidais gelificadas [186]. A diluição das dispersões coloidais em fluido lacrimal artificial resultou, tal como esperado, numa diminuição da viscosidade das formulações oftálmicas.

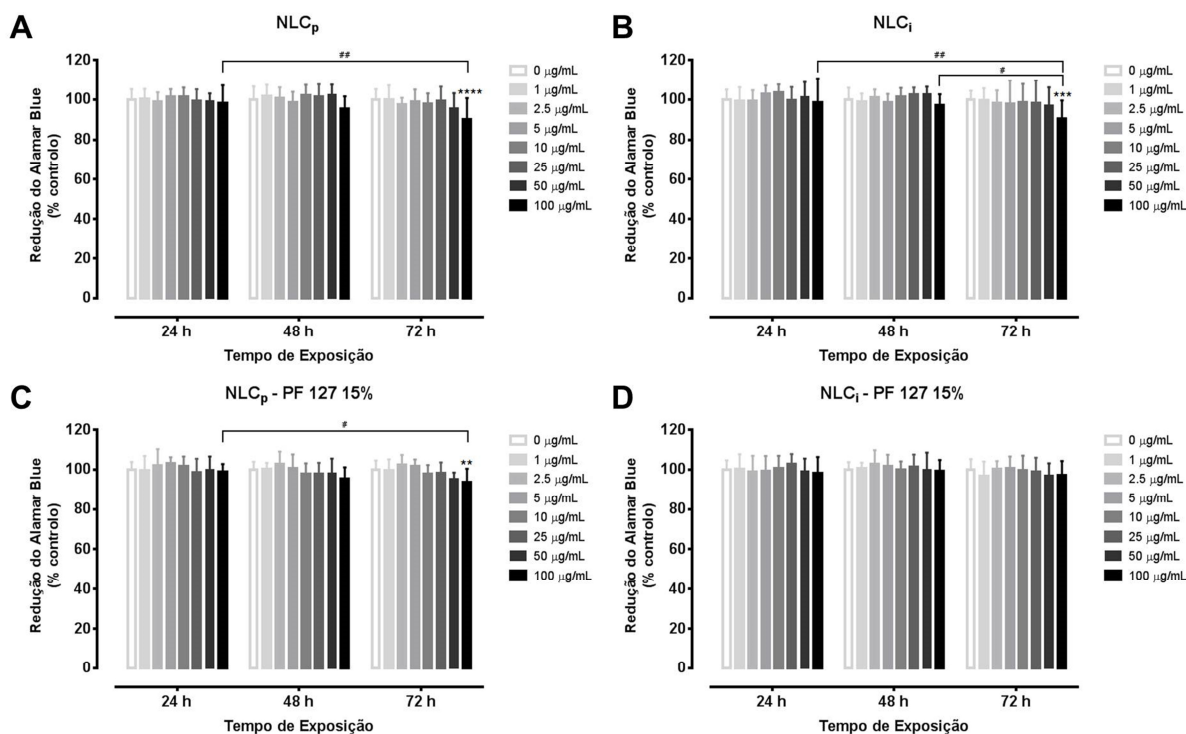
#### 5.3.2.11 Estudos de biocompatibilidade: Ensaio da redução do Alamar Blue

No presente estudo, de forma a assegurar a segurança de utilização das formulações oftálmicas desenvolvidas, foi utilizado como modelo *in vitro* a linha celular do retinoblastoma humano Y-79, tendo sido selecionado o ensaio de redução do Alamar



Blue para avaliar a citotoxicidade. O ensaio de redução do Alamar Blue permite a análise quantitativa da viabilidade celular e da proliferação celular depois de expor a linha celular selecionada às formulações desenvolvidas. Este ensaio baseia-se na capacidade das células metabolicamente ativas em converter o reagente Alamar Blue num indicador fluorescente e colorimétrico. As células não viáveis ou danificadas têm uma atividade metabólica inativa ou muito reduzida, reduzindo uma menor quantidade de reagente, gerando um sinal proporcionalmente menor.

Como se pode verificar na Figura 61, as formulações testadas demonstraram ser muito inócuas para as células Y-79, uma vez que a percentagem de redução do reagente Alamar Blue foi sempre superior a 90%, até às 72 h de exposição [90,1%, 90,2% e 93,3% para 100  $\mu\text{g/mL}$  de  $\text{NLC}_\text{P}$ ,  $\text{NLC}_\text{I}$  e  $\text{NLC}_\text{P}$ -PF 127 15% respetivamente, quando comparado com o controlo (0  $\mu\text{g/mL}$ )]. Relativamente à percentagem de viabilidade celular quando em contacto com a formulação  $\text{NLC}_\text{I}$ -PF 127 15% a uma concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ , conclui-se que não se registou qualquer diferença estatística, verificando-se uma viabilidade celular de 100% ao fim das 72 horas de exposição. Portanto, de acordo com os resultados obtidos, as formulações desenvolvidas poderão ser utilizadas com segurança na administração ocular de fármacos, não causando qualquer tipo de dano celular.



**Figura 61.** Efeito da adição das diferentes dispersões coloidais desenvolvidas na viabilidade celular. **(A)**  $\text{NLC}_\text{P}$  – NLC placebo; **(B)**  $\text{NLC}_\text{I}$  – NLC encapsulando o ibuprofeno;

(C) NLC<sub>p</sub>-PF 127 15% - NLC placebo com PF 127 15% (m/m); (D) NLC<sub>i</sub>-PF 127 15% - NLC encapsulando o ibuprofeno com PF 127 15% (m/m). Os resultados estão apresentados como Média  $\pm$  DP de 4 experiências independentes (tendo sido cada experiência efetuada pelo menos em triplicado) e expressos como percentagem de redução do reagente Alamar Blue relativamente às células de controlo [redução do Alamar Blue (% do controlo)]. As comparações estatísticas entre os grupos foram efetuadas recorrendo ao Two-way ANOVA, seguido do *Bonferroni's multiple comparisons post hoc test* [**\*\*** p <0,01, **\*\*\*** p <0,001, **\*\*\*\*** p <0,0001 concentração vs. controlo (0 µg/mL); **#**p <0,05, **##**P <0,01 48 ou 24 h vs. 72 h, para cada concentração].

### 5.3.2.12 Ensaio *in vitro* da irritabilidade ocular: Ensaio de HET-CAM

O ensaio de HET-CAM fornece informações muito úteis sobre os possíveis efeitos adversos que podem ocorrer nos tecidos oculares após a exposição a uma determinada substância teste [383]. O ensaio HET-CAM considera-se validado se os controlos positivos (solução de NaOH 0,1 N e a solução de laurilsulfato de sódio (SDS) a 1%) apresentam uma pontuação cumulativa de 19 e 10 respetivamente, e se o controlo negativo (solução de NaCl a 0,9%) apresenta uma pontuação cumulativa de 0. Estes resultados estão devidamente apresentados na Tabela XXV.

**Tabela XXV.** Resultados obtidos nos controlos do ensaio de irritabilidade ocular (n=3).

	Pontuação obtida (Média $\pm$ DP)	Conformidade
Controlo Negativo – NaCl 0,9%	0 $\pm$ 0	Conforme
Controlo Positivo – NaOH 0,1 N	19 $\pm$ 0	Conforme
Controlo Positivo – SDS 1%	11,33 $\pm$ 1,15	Conforme

Os resultados obtidos demonstram que o ensaio de HET-CAM encontra-se completamente validado obtendo-se para o controlo negativo uma pontuação cumulativa de 0, e para os controlos positivos valores de 19 $\pm$ 0 para a solução de NaOH 0,1 N e de 11,33 $\pm$ 1,15 para a solução de SDS 1%. A dispersão coloidal desenvolvida, NLC<sub>i</sub>-PF 127 15% (m/m), foi testada a duas temperaturas, 4°C e 37°C. Salienta-se que a realização do ensaio a 4°C (temperatura de armazenamento) pode provocar a vasoconstrição dos vasos sanguíneos. Para o ensaio realizado a 4°C foram utilizados 3 ovos (n=3), sendo que, para a amostra testada a 37°C foram utilizados 5 ovos, por ter sido rejeitado um dos ovos do primeiro grupo de 3, o que motivou a repetição do teste. As Tabelas XXVI, XXVII

e XXVIII demonstram as pontuações obtidas por cada tipo de lesão, a cada tempo de ensaio, e as pontuações cumulativas para a formulação testada nas duas temperaturas de ensaio.

**Tabela XXVI.** Resultados brutos para a amostra testada à temperatura de 37°C (n=5).

Ovo	Efeito	Pontuação			TOTAL
		0,5 min	2 min	5 min	
1	Lise	0	0	1	1
	Hemorragia	0	0	0	
	Coagulação	0	0	0	
2	Lise	0	0	1	1
	Hemorragia	0	0	0	
	Coagulação	0	0	0	
3	Lise	0	0	0	0
	Hemorragia	0	0	0	
	Coagulação	0	0	0	
4	Lise	0	0	0	0
	Hemorragia	0	0	0	
	Coagulação	0	0	0	
5	Lise	0	0	1	1
	Hemorragia	0	0	0	
	Coagulação	0	0	0	
Pontuação final (Média)					0,93
Pontuação final (Desvio-padrão)					0,55



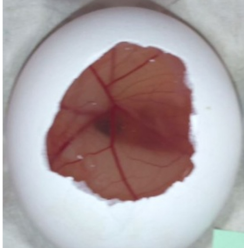
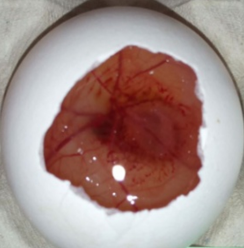


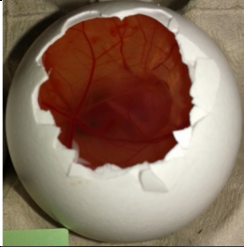

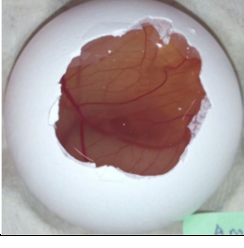
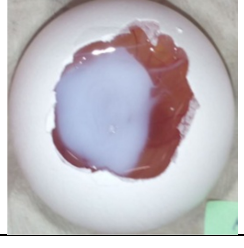
**Tabela XXVII.** Resultados brutos para a amostra testada à temperatura de 4°C (n=3).

Ovo	Efeito	Pontuação			TOTAL
		0,5 min	2 min	5 min	
1	Lise	0	0	0	0
	Hemorragia	0	0	0	
	Coagulação	0	0	0	
2	Lise	0	0	0	0
	Hemorragia	0	0	0	
	Coagulação	0	0	0	
3	Lise	0	0	0	0
	Hemorragia	0	0	0	
	Coagulação	0	0	0	
Pontuação final (Média)					0
Pontuação final (Desvio-padrão)					0

**Tabela XXVIII.** Resultados gerais obtidos para a amostra (n=3 a 4°C; n=5 a 37°C).

	Pontuação obtida (Média $\pm$ DP)	Classificação
Amostra (armazenada a 4°C)	0 $\pm$ 0	Não irritante (NI)
Amostra (armazenada a 37°C)	0,93 $\pm$ 0,55	Não irritante (NI)

Em ambos as temperaturas de ensaio, a formulação oftálmica alvo de teste foi considerada não irritante, com pontuações cumulativas inferiores a 9. A formulação testada a 4°C apresentou uma pontuação cumulativa de 0, enquanto a mesma formulação testada a 37°C apresentou uma pontuação cumulativa de 0,93 $\pm$ 0,55. A diferença de pontuação observada entre as diferentes temperaturas de ensaio poderá ser explicada pela possível indução de vasoconstrição pela amostra refrigerada, prevenindo a observação de hemorragia ou lise dos capilares da membrana. As fotografias da membrana CAM dos diferentes ovos, antes e depois do tratamento com a substância alvo de teste e respetivos controlos (negativo e positivos), às diferentes temperaturas, estão ilustradas na Figura 62.

	Antes do início do ensaio		Final do ensaio	
<b>NaCl 0,9%</b> (Controlo negativo)				
<b>NaOH 0,1N</b> (Controlo positivo)				
<b>SDS 1%</b> (Controlo positivo)				
<b>Amostra (4°C)</b>				
<b>Amostra (37°C)</b>				

**Figura 62.** Fotografias das HET-CAM de um ovo por grupo testado, antes da aplicação da amostra/solução e no final do ensaio (5 minutos).

### 5.3.2.13 Ensaios de liberação/dissolução *in vitro*

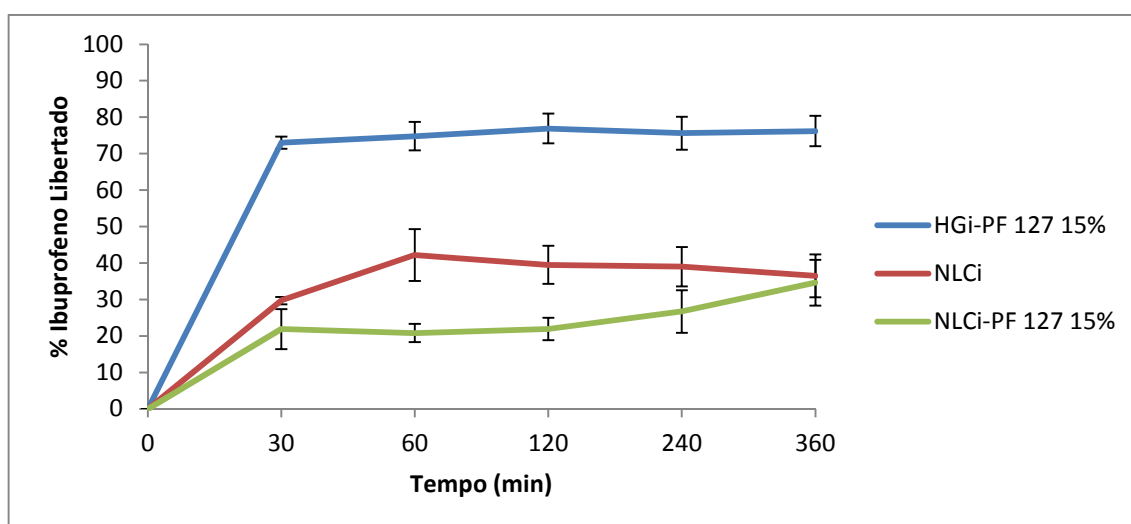
#### 5.3.2.13.1 Validação do método de doseamento do ibuprofeno

A validação do método de doseamento do ibuprofeno pode ser consultada no subcapítulo 4.3.2.7.1.

O método de doseamento espectrofotométrico do ibuprofeno apresentou-se linear na gama de concentrações utilizadas, preciso (em termos de repetibilidade) e exato, concluindo-se desta forma que pode ser utilizado para o doseamento do ibuprofeno libertado/dissolvido na solução tampão fosfato pH 7,4 a partir do hidrogel de PF 127 e das dispersões coloidais.

#### 5.3.2.13.2 Resultados do ensaio de liberação/dissolução *in vitro*

Os perfis de liberação *in vitro* do ibuprofeno a partir do hidrogel PF 127 15% (m/m) e das dispersões coloidais com e sem PF 127 15% (m/m) foram realizados usando a solução tampão fosfato pH 7,4 como meio de dissolução e estão ilustrados na Figura 63.



**Figura 63.** Perfis de liberação *in vitro* do ibuprofeno a partir das formulações HGi-PF 127 15% (m/m), NLCi e NLCi-PF 127 15% (m/m).

Verificou-se que após 30 minutos de ensaio, 73% de ibuprofeno foi libertado a partir do hidrogel PF 127 15% (m/m). Ao fim de 6 horas de ensaio, 76,2% de ibuprofeno foi libertado para o meio de dissolução. Como seria de esperar, a inclusão do ibuprofeno em nanopartículas lipídicas do tipo NLC promoveu uma libertação prolongada do ibuprofeno. De acordo com o que mostra a Figura 63, após 30 minutos de ensaio, somente 29,7% de ibuprofeno tinha sido libertado da formulação NLC<sub>i</sub>, sendo que ao fim das 6 horas de ensaio, somente 36,5% de ibuprofeno tinha sido libertado para o meio de dissolução. A natureza lipídica e a alta eficácia de encapsulação do ibuprofeno nos NLC contribuíram decisivamente para a libertação prolongada do ibuprofeno. Este facto foi igualmente relatado em outros trabalhos por diferentes autores [274,316,319,392].

A adição de 15% (m/m) de polímero termossensível PF 127 à dispersão coloidal promoveu uma libertação ainda mais prolongada do ibuprofeno. Verifica-se que após 30 minutos de ensaio, somente 21,9% de ibuprofeno foi libertado a partir da dispersão coloidal, enquanto após 4 horas de ensaio a quantidade de ibuprofeno libertada aumentou para 26,7%. Ao fim das 6 horas de ensaio, somente 34,6% de ibuprofeno foi libertado a partir da formulação NLC<sub>i</sub>-PF 127 15% (m/m). Conclui-se assim que a inclusão de uma rede polimérica termossensível na dispersão coloidal adiciona mais uma barreira de difusão que contribui para uma libertação mais prolongada do fármaco veiculado [186]. Através do cálculo do factor de semelhança ( $f_2$ ) conclui-se que os perfis de dissolução do NLC<sub>i</sub> e do NLC<sub>i</sub>-PF 127 15% (m/m) são diferentes ( $f_2=42,6$ ).

#### 5.4 Conclusões

Neste estudo foram desenvolvidas formulações oftálmicas tendo por base a associação de duas estratégias para a libertação prolongada de fármacos, normalmente usadas em separado, nomeadamente a utilização de vetores lipídicos nanoestruturados (NLC) associada a polímeros sensíveis a estímulos. Desta forma, procedeu-se à adição de polímeros termossensíveis a nanotransportadores coloidais contendo ibuprofeno com o objetivo de aumentar o tempo de residência deste fármaco na zona pré-corneal.

Os NLC preparados apresentaram uma eficácia de encapsulação de aproximadamente 87%, tendo as nanopartículas um tamanho médio (Z-average) entre 120 e 150 nm. A dispersão coloidal preparada caracterizou-se por ser uma monodispersão, uma vez que apresentou um índice de polidispersão inferior a 0,3, tendo um potencial zeta positivo superior a 30 mV. A adição de PF 127, numa concentração

que assegurasse a transição sol-gel a uma temperatura inferior a 35°C, não promoveu alterações substanciais nas propriedades físico-químicas das dispersões de NLC.

Os ensaios de biocompatibilidade realizados com a linha celular do retinoblastoma humano Y-79, tendo por base a redução do reagente Alamar Blue, demonstraram que as formulações desenvolvidas não apresentaram toxicidade em concentrações situadas entre 0 e 100 µg/mL, após contacto com as células durante 72 horas. Da mesma forma, foi realizado o ensaio de irritabilidade ocular HET-CAM que confirmou que as formulações desenvolvidas não causam irritação ocular. Por fim, os ensaios de libertação *in vitro* demonstraram que o ibuprofeno apresentou uma libertação prolongada ao longo do tempo.

Os resultados obtidos indicam que a combinação de vetores lipídicos nanoestruturados (NLC) com polímeros sensíveis a estímulos constitui uma excelente estratégia para aumentar a biodisponibilidade do ibuprofeno no segmento posterior do globo ocular, evitando assim as administrações sucessivas de colírio ao longo do dia ou o recurso a injeções intraoculares. As formulações desenvolvidas não apresentaram qualquer tipo de citotoxicidade e promoveram uma libertação prolongada do ibuprofeno.



## **6. Preparação e caracterização de um colírio termossensível com propriedades mucoadesivas contendo NLC para a libertação modificada de ibuprofeno**

### **6.1 Introdução**

A novidade do trabalho experimental descrito neste capítulo prende-se com o facto de se adicionar à dispersão coloidal dois polímeros sensíveis a estímulos distintos. A especificidade das propriedades físico-químicas dos tecidos oculares pode ser aproveitada para aumentar a biodisponibilidade dos sistemas coloidais usando polímeros sensíveis a diferentes estímulos. Os polímeros selecionados neste estudo foram o PF 127 (polímero sensível à temperatura) e o quitosano (polímero sensível ao pH e com propriedades mucoadesivas). A adição de um polímero termossensível como o PF 127 a uma formulação oftálmica provoca a transição sol-gel da dispersão coloidal após o contacto da formulação oftálmica com a temperatura da superfície ocular, enquanto a adição do quitosano à formulação oftálmica, faz com que a formulação possa estabelecer interações eletrostáticas com a mucina presente nos tecidos oculares. A combinação de dois polímeros sensíveis a estímulos distintos na mesma formulação tem por objetivo aumentar a eficácia terapêutica do fármaco veiculado, garantindo desta forma, que a formulação sofre uma transição sol-gel o mais rapidamente possível após entrar em contacto com a superfície ocular.

De forma a preparar NLC com propriedades físico-químicas adequadas e com uma boa eficácia de encapsulação, procedeu-se inicialmente à escolha de um lípido sólido e de um lípido líquido que melhor solubilizasse o ibuprofeno. A solubilidade do fármaco nos lípidos e a compatibilidade entre os lípidos selecionados foram confirmadas recorrendo à técnica de calorimetria diferencial de varrimento (DSC). Após a preparação das diferentes dispersões coloidais e simulando as condições fisiológicas, não só em termos de temperatura como também de diluição no fluido lacrimal, procedeu-se ao ajuste da quantidade de PF 127 necessária para que a formulação gelificasse na superfície ocular, imediatamente após a sua administração. De seguida procedeu-se ao ajuste da osmolaridade, selecionando o agente isotonzante que menos afetasse as propriedades físico-químicas das nanopartículas lipídicas. Procedeu-se, de seguida, à caracterização das diferentes dispersões coloidais preparadas, no que se refere ao tamanho médio de partículas (Z-average), índice de polidispersão (PI), potencial zeta (ZP), eficácia de encapsulação (EE) e capacidade de carga (LC) do ibuprofeno nos NLC.

Como forma de avaliar o comportamento das diferentes dispersões coloidais em condições fisiológicas procedeu-se ao estudo da interação com a lisozima e com a mucina presentes no fluido lacrimal artificial. A toxicidade dos sistemas desenvolvidos foi efetuada através da realização de ensaios de biocompatibilidade utilizando a linha celular do retinoblastoma humano Y-79 tendo por base a redução do reagente Alamar Blue. Por fim, procedeu-se à realização de ensaios de libertação *in vitro* de forma a avaliar a libertação do ibuprofeno a partir das diferentes formulações, ao longo do tempo.

## 6.2 Materiais e Métodos

A lista de matérias-primas, reagentes e equipamentos utilizados nos ensaios descritos neste capítulo está indicada no capítulo 2. De igual modo, os métodos utilizados neste capítulo (estudo de compatibilidade e solubilidade lipídica, determinação da osmolalidade, determinação da temperatura de transição de fase solução-gel, determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão e do potencial zeta, determinação da morfologia das nanopartículas por microscopia eletrónica de varrimento de alta resolução a baixa temperatura (cryoSEM), determinação da eficácia de encapsulação e da capacidade de carga das NLC, análise térmica por calorimetria diferencial de varrimento (DSC), análise dos parâmetros da textura antes e após a diluição em fluido lacrimal artificial, análise reológica antes e após a diluição em fluido lacrimal artificial, avaliação da estabilidade das dispersões lipídicas na presença de fluido lacrimal artificial e na presença de fluido lacrimal artificial com mucina ou lisozima, estudos de mucoadesão na presença de fluido lacrimal artificial com mucina ou lisozima (análise reológica, determinação da força e do trabalho de adesão), estudos de biocompatibilidade e ensaios de libertação/dissolução *in vitro*) foram realizados de acordo com as metodologias descritas no capítulo 2.

## 6.3 Resultados e Discussão

### 6.3.1 Estudo de compatibilidade e solubilidade lipídica

A solubilidade, a compatibilidade e a miscibilidade entre os lípidos escolhidos e o ibuprofeno é um dos aspetos mais importantes a considerar com vista a obter transportadores lipídicos nanoestruturados (NLC) com boas características, ótima

estabilidade e elevada eficácia de encapsulação e capacidade de carga [14,262,319,346]. Inicialmente foram escolhidos treze lípidos sólidos (Precirol® ATO 5, Gelucire® 44/14, Gelucire® 43/01, Gelucire® 50/13, Lipocire® DM, Witepsol E85, Imwitor 900K, Imwitor 491, Dynasan 114, Dynasan 118, Softisan 142, cetil palmitado e ácido esteárico) e três lípidos líquidos (Miglyol® 812, Softisan 645 e perhidrosqualene).

Os resultados obtidos mostraram que só cinco dos lípidos sólidos utilizados conseguiram solubilizar o ibuprofeno nas concentrações testadas (0,2 e 1% m/m), nomeadamente, o Precirol® ATO 5, o Gelucire® 44/14, o Gelucire® 43/01, o Lipocire® DM pellets e o Dynasan® 118. Dentre os lípidos líquidos testados, somente o Miglyol® 812 solubilizou o ibuprofeno, independentemente da concentração de fármaco utilizado.

A miscibilidade entre os cinco lípidos sólidos selecionados e o lípido líquido (Miglyol® 812) foi avaliada em diferentes proporções, nomeadamente 90:10, 80:20, 70:30 e 60:40 (m/m), mas somente o Precirol® ATO 5 demonstrou miscibilidade com o lípido líquido até à proporção 60:40 (m/m), não se verificando o aparecimento ou a presença de gotículas de óleo na matriz lipídica formada. De acordo com Müller *et al.* (2002) [262] e Doktorovova e Souto (2009) [314], os NLC com maior quantidade de lípido líquido apresentam uma maior eficácia de encapsulação do fármaco veiculado. Por essa razão, os NLC utilizados neste estudo foram preparados com o Precirol® ATO 5 como lípido sólido e com o Miglyol® 812 como lípido líquido, numa proporção de 60:40 (m/m). A Tabela XXIX mostra a composição detalhada dos NLC produzidos neste estudo.

**Tabela XXIX.** Composição das diferentes dispersões NLC (P - Placebo; i - ibuprofeno; NLC<sub>P</sub> - NLC placebo; NLC<sub>i</sub> – NLC encapsulando o ibuprofeno).

<b>Composição (% m/m)</b>	<b>NLC<sub>P</sub></b>	<b>NLC<sub>i</sub></b>
Lípido Sólido	6,0	6,0
Lípido Líquido	4,0	4,0
Ibuprofeno	-	0,2
Tween® 80	2,5	2,5
Brometo de Cetiltrimetilamónio (CTAB)	0,5	0,5
Água Ultrapura	q.b.p. 100	q.b.p. 100

### 6.3.2 Caracterização físico-química das dispersões coloidais de NLC

#### 6.3.2.1 Determinação da quantidade de polímero PF 127 a adicionar à dispersão coloidal

Para obter colírios termossensíveis constituídos por dispersões de NLC gelificadas com quitosano (NLC<sub>i</sub>-CS) é necessário determinar a quantidade correta de PF 127 para que ocorra a transição sol-gel da formulação oftálmica imediatamente após contactar com a temperatura da superfície ocular. A Figura 64 ilustra a incorporação a frio do polímero termossensível PF 127 na dispersão coloidal NLC<sub>i</sub>-CS.



**Figura 64.** Incorporação a frio do polímero termossensível PF 127 na dispersão coloidal NLC<sub>i</sub>-CS.

A adição do polímero termossensível PF 127, numa concentração específica, permite que o colírio possa ser administrado na forma líquida, aumentando a viscosidade da formulação somente quando a formulação entrar em contacto com a temperatura da superfície ocular. Desta forma, o aumento da viscosidade da formulação provoca o aumento do tempo de residência na zona pré-corneal e desta forma aumenta a biodisponibilidade do fármaco ocular [11,14,39,45,46,344]. Como já foi referido, é fundamental considerar que uma formulação oftálmica depois de administrada sofre uma diluição no fluido lacrimal. Normalmente, os colírios convencionais libertam uma gota com um volume situado entre os 25 e os 56  $\mu\text{L}$  (sendo o volume médio de 39  $\mu\text{L}$ ) e o volume normal de fluido lacrimal na superfície ocular situa-se entre 7 e 10  $\mu\text{L}$  [39,41].

Assim, tendo em conta os valores médios do volume de colírio e do volume do fluido lacrimal, neste estudo, de forma a simular as condições fisiológicas, considerou-se

que a formulação oftálmica depois de ser administrada sofre uma diluição no fluido lacrimal na proporção de 40:7 (formulação:STF). Desta forma, a temperatura de transição sol-gel da formulação oftálmica deve ocorrer a uma temperatura inferior a 35°C, tendo em atenção a diluição que a formulação sofre após ser administrada no globo ocular [344].

Para este estudo utilizou-se como formulação referência a dispersão NLC<sub>i</sub>-CS 1% na qual se adicionaram diferentes percentagens de polímero PF 127. Como se pode verificar na Tabela XXX, simulando as condições fisiológicas, somente as dispersões coloidais com uma concentração de polímero termossensível igual ou superior a 20% (m/m) sofreram uma transição sol-gel inferior à temperatura de 35°C.

**Tabela XXX.** Temperaturas de transição sol-gel das dispersões NLC<sub>i</sub>-CS preparadas com diferentes percentagens de PF 127 (Média ± DP, n=3).

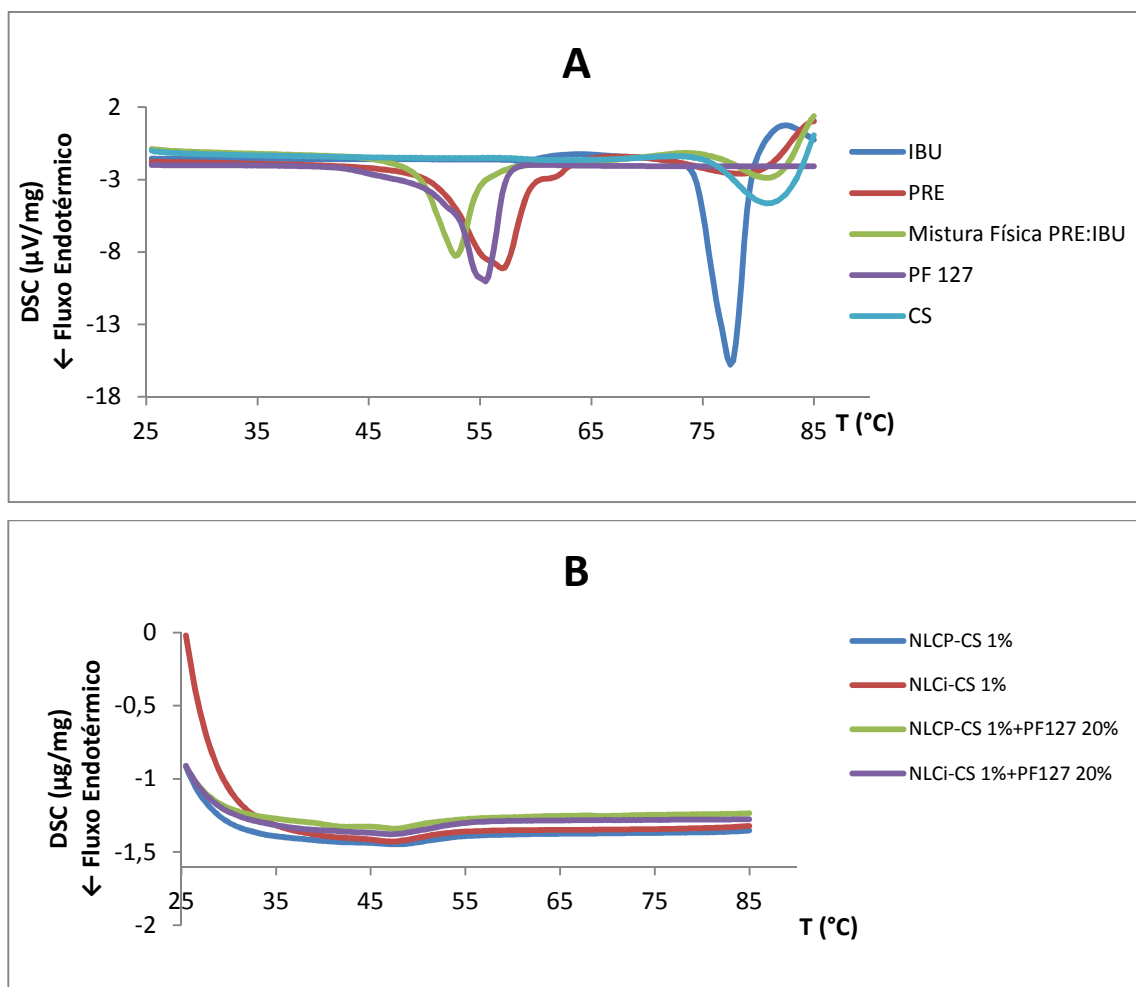
	Formulação Original (°C)	Depois de diluição em STF (°C)
NLC <sub>i</sub> -CS 1%+PF 127 17%	31,0 ± 1,0	> 40,0
NLC <sub>i</sub> -CS 1%+PF 127 19%	23,3 ± 0,6	42,0 ± 1,0
NLC <sub>i</sub> -CS 1%+PF 127 20%	19,7 ± 0,6	28,7 ± 0,6
NLC <sub>i</sub> -CS 1%+PF 127 21%	20,3 ± 0,6	27,3 ± 0,6
NLC <sub>i</sub> -CS 1%+PF 127 23%	16,3 ± 0,6	23,3 ± 0,6

Depois de diluir as diferentes dispersões coloidais em fluido lacrimal artificial, a temperatura de transição sol-gel da formulação NLC<sub>i</sub>-CS 1%+PF 127 20% foi de 28,7±0,6°C, enquanto a temperatura de transição de sol-gel das dispersões coloidais com 21 e 23% (m/m) foi de 27,3±0,6°C e 23,3±0,6°C, respetivamente. Assim, a quantidade de polímero termossensível utilizado para prosseguir este estudo foi a menor possível, mas que garantisse a gelificação da formulação nas condições fisiológicas, ou seja, 20% (m/m).

#### 6.3.2.2 Análise térmica por calorimetria diferencial de varrimento (DSC)

A compatibilidade, a miscibilidade e a solubilidade entre os lípidos selecionados e o ibuprofeno foram estudados usando a técnica de calorimetria diferencial de varrimento (DSC) [281,307,319]. As análises por DSC são uma etapa fundamental de forma a produzir nanopartículas com boas propriedades físico-químicas, excelentes características de estabilidade e elevados valores de eficácia de encapsulação e de

capacidade de carga. A Figura 65 mostra os termogramas das matérias-primas a granel, da mistura física e das diferentes dispersões coloidais de NLC.



**Figura 65.** Perfis térmicos obtidos por DSC: **(A)** Termogramas do ibuprofeno, do lípido, do polímero PF 127, do polímero CS e da mistura lipídica com o ibuprofeno. **(B)** Termogramas das dispersões NLC-CS placebo ( $\text{NLC}_p\text{-CS}$  1%), das dispersões NLC-CS encapsulando o ibuprofeno ( $\text{NLC}_i\text{-CS}$  1%), das NLC-CS placebo com PF 127 20% (m/m) ( $\text{NLC}_p\text{-CS}$  1%+PF 127 20%) e das dispersões NLC-CS com ibuprofeno e com PF 127 20% (m/m) ( $\text{NLC}_i\text{-CS}$ +PF 127 20%).

Como pode ser visto na Figura 65 (A), o termograma do lípido sólido Precirol<sup>®</sup> ATO 5 exibiu um pico endotérmico com uma temperatura *onset* de 51,0 $^{\circ}\text{C}$  e uma temperatura de fusão de 56,8 $^{\circ}\text{C}$ , enquanto o ibuprofeno exibiu um pico endotérmico com uma temperatura *onset* de 74,3 $^{\circ}\text{C}$  e uma temperatura de fusão de 77,6 $^{\circ}\text{C}$ . A mistura física do lípido sólido selecionado com o ibuprofeno na proporção 60:40 mostrou um

evento endotérmico único com uma temperatura de fusão de 52,5°C. O termograma da referida mistura física exibiu uma diminuição da temperatura de fusão quando comparado com o termograma do lípido sólido, não mostrando qualquer evento térmico na zona de fusão do ibuprofeno. Isto acontece devido ao facto de existirem interações entre o lípido sólido e o ibuprofeno, ocorrendo a solubilização do fármaco na matriz lipídica, podendo os NLC ser preparados com este lípido sólido [319,395,396]. O polímero termossensível PF 127 apresentou um pico endotérmico com uma temperatura *onset* de 52,3°C e uma temperatura de fusão de 55,2°C, enquanto o polímero CS apresentou uma temperatura *onset* de 75,5°C e uma temperatura de fusão de 80,6°C.

Como se pode verificar na Figura 65 (B), as temperaturas de fusão das diferentes dispersões coloidais foram superiores a 40°C, assegurando-se assim, que estas permanecem no estado sólido após a sua administração ocular, evitando desta forma o aparecimento de *supercooled melts* [276,395]. Verifica-se que os termogramas dos NLC são muito diferentes dos termogramas das matérias-primas. Este facto pode ser explicado por diferentes razões, nomeadamente, pelo tamanho das nanopartículas lipídicas ou devido às interações entre os lípidos e o tensioativo usado na produção dos NLC [271,398]. As temperaturas de fusão das diferentes dispersões coloidais ensaiadas foram as seguintes: NLC<sub>p</sub>-CS1%- 47,5°C; NLC<sub>i</sub>-CS1%- 47,0°C; NLC<sub>p</sub>-CS1%+PF 127 20%- 47,3°C; NLC<sub>i</sub>-CS1%+PF 127 20%- 46,8°C. A adição do ibuprofeno às dispersões coloidais promoveu uma pequena descida das temperaturas de fusão, não se verificando qualquer evento térmico na zona de fusão do ibuprofeno. Este facto confirma que o ibuprofeno se encontrava solubilizado na matriz lipídica e encapsulado nas nanopartículas lipídicas [307,319].

#### 6.3.2.3 Efeito da adição de diferentes agentes isotonizantes no aspeto físico, na viscosidade e nas propriedades físico-químicas dos NLC

Os agentes isotonizantes adicionados às formulações oftálmicas devem manter a estabilidade física (não podem causar a separação de fases ou qualquer outra alteração física), a viscosidade e o potencial zeta (ZP) das dispersões coloidais. Como mostra a Tabela XXXI, as formulações NLC<sub>i</sub>-CS 1% e NLC<sub>i</sub>-CS 1%+PF 127 20% (m/m) foram utilizadas como formulações de referência e tornadas isotónicas com recurso a cinco agentes isotonizantes diferentes, nomeadamente, D-Manitol, solução de sorbitol a 70%, glicerina, propilenoglicol e cloreto de sódio.

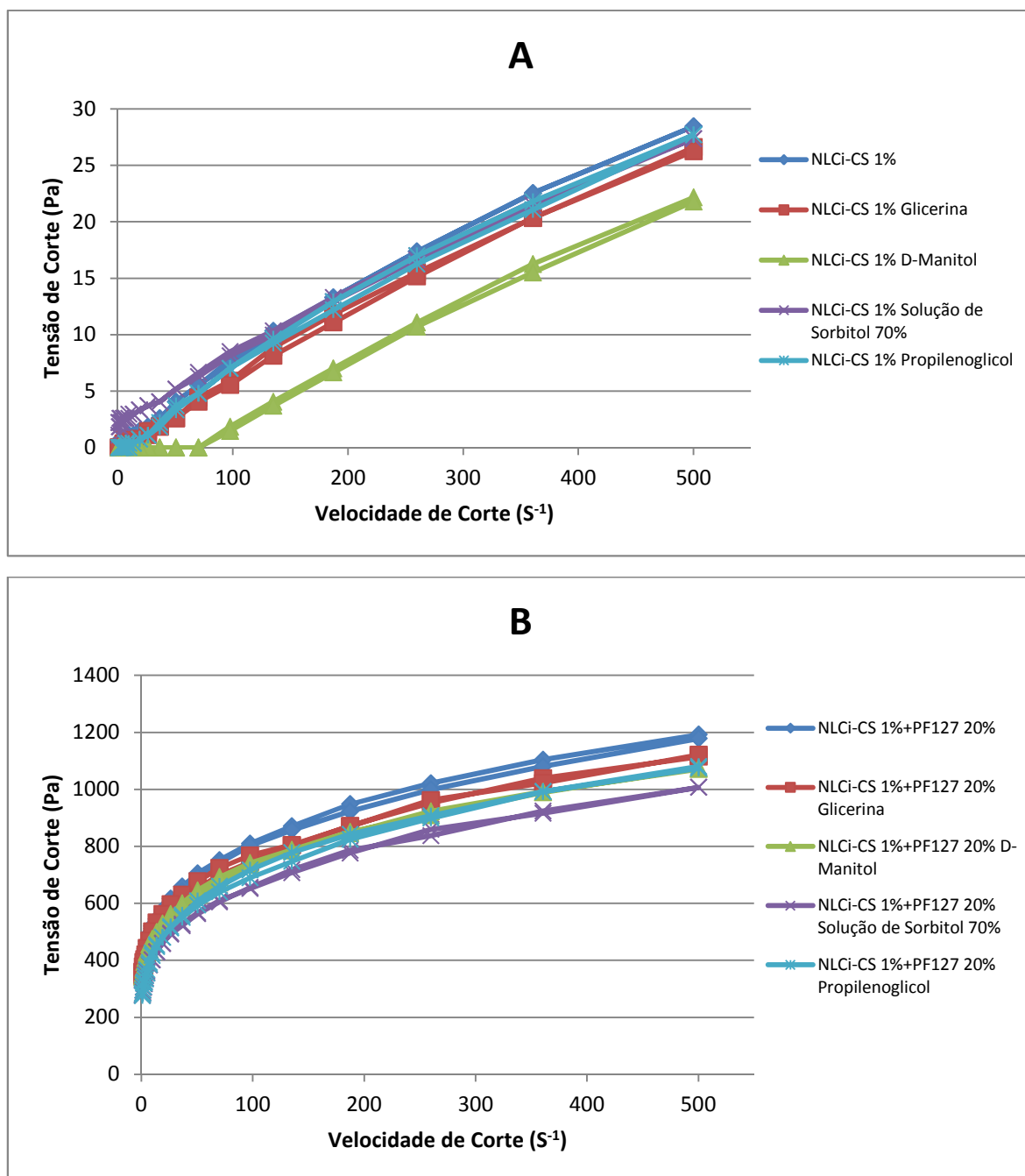
**Tabela XXXI.** Efeito da adição de diferentes agentes isotonzantes às dispersões NLC.

Formulações	Quantidade de agente isotonzante adicionado (m/m)	Valor de Osmolalidade (mOsm/kg)	Aparência física
NLC <sub>i</sub> -CS 1% Glicerina	2,30	300	Líquido/Homogéneo
NLC <sub>i</sub> -CS 1% D-Manitol	4,20	310	Líquido/Homogéneo
NLC <sub>i</sub> -CS 1% Solução de Sorbitol 70%	5,50	300	Líquido/Homogéneo
NLC <sub>i</sub> -CS 1% Propilenoglicol	1,90	300	Líquido/Homogéneo
NLC <sub>i</sub> -CS 1% NaCl	0,85	310	Líquido/Separação de fases
NLC <sub>i</sub> -CS 1%+PF 127 20% Glicerina	2,00	300	Líquido/Homogéneo
NLC <sub>i</sub> -CS 1%+PF 127 20% D-Manitol	3,90	310	Líquido/Homogéneo
NLC <sub>i</sub> -CS 1%+P F127 20% Solução de Sorbitol 70%	5,00	290	Líquido/Homogéneo
NLC <sub>i</sub> -CS 1%+PF 127 20% Propilenoglicol	1,60	310	Líquido/Homogéneo
NLC <sub>i</sub> -CS 1%+PF 127 20% NaCl	0,70	300	Sólido/Separação de fases

Os valores de osmolalidade das diferentes dispersões NLC<sub>i</sub> com e sem a adição de polímero PF 127 variaram entre 290 e 310 mOsm/kg. Depois de medidos os valores de osmolalidade, as diferentes formulações foram armazenadas no frigorífico a 4°C durante 24 h. Decorrido este tempo, as formulações foram cuidadosamente observadas, sendo que, as formulações que tinham cloreto de sódio tinham sofrido separação de fases. As restantes formulações apresentavam um aspeto normal sem qualquer tipo de alterações físicas visíveis, concluindo-se que os restantes quatro agentes isotonzantes não provocaram alterações físicas nas dispersões coloidais.

A Figura 66 ilustra os reogramas das dispersões coloidais NLC<sub>i</sub>-CS 1% sem (A) ou com PF 127 20% (m/m) (B) com os diferentes agentes isotonzantes a uma temperatura de 35±0,5°C.



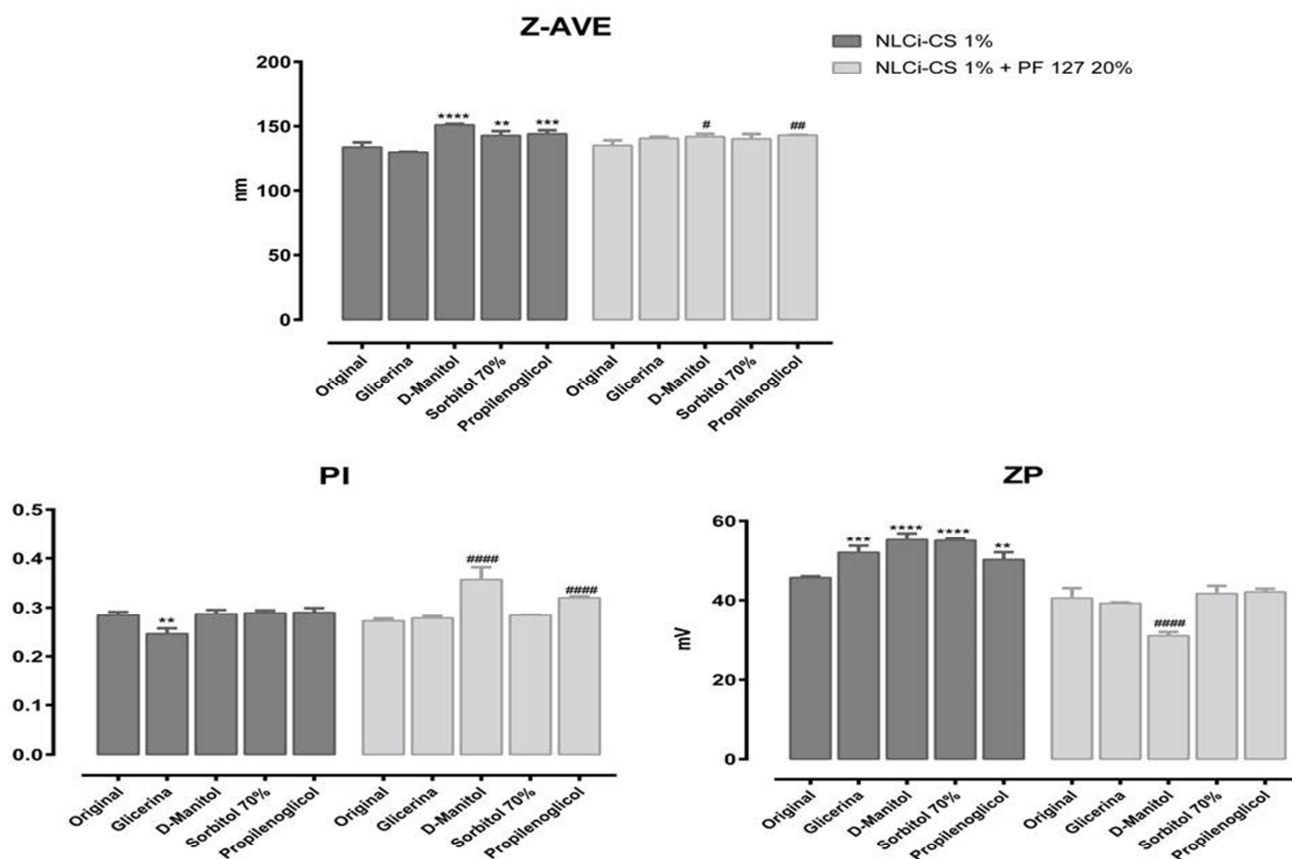


**Figura 66.** Reogramas das dispersões NLC<sub>i</sub>-CS com diferentes agentes isotonzantes sem **(A)** e com PF 127 20% (m/m) **(B)**.

A análise reológica demonstrou que a adição dos diferentes agentes isotonzantes não causou alterações significativas na viscosidade das diferentes dispersões coloidais. Estas apresentaram valores de tensão de corte muito baixos (inferiores a 30 Pa para a máxima velocidade de corte) e um comportamento Newtoniano. Como seria de esperar, a adição do polímero PF 127 20% (m/m) às dispersões coloidais NLC<sub>i</sub>-CS 1% (m/m)

provocou um aumento da viscosidade. Todas as formulações apresentaram um comportamento não-Newtoniano plástico sem tixotropia, não havendo grandes diferenças entre os perfis reológicos. Entre todos os agentes isotonizantes testados, foi a glicerina que causou menos alterações nos perfis reológicos das diferentes dispersões.

A Figura 67 mostra os resultados de Z-average, índice de polidispersão (PI) e de potencial zeta (ZP) das diferentes dispersões coloidais NLCi-CS 1%, com e sem PF 127 20% (m/m), com os diferentes agentes isotonizantes, usando a técnica de dispersão dinâmica da luz (DLS).



Formulações	Z-Ave (nm)	PI	ZP (mV)
NLC <sub>i</sub> -CS 1% (Original)	134,1 ± 3,5	0,284 ± 0,007	45,67 ± 0,35
NLC <sub>i</sub> -CS 1% Glicerina	129,4 ± 0,9	0,246 ± 0,011	52,00 ± 1,66
NLC <sub>i</sub> -CS 1% D-Manitol	151,1 ± 0,8	0,287 ± 0,008	55,20 ± 1,65
NLC <sub>i</sub> -CS 1% Solução de Sorbitol 70%	143,0 ± 3,3	0,289 ± 0,005	55,03 ± 0,55
NLC <sub>i</sub> -CS 1% Propilenoglicol	144,3 ± 2,6	0,290 ± 0,009	50,20 ± 1,82
NLC <sub>i</sub> -CS 1% + PF 127 20% (Original)	135,3 ± 3,9	0,272 ± 0,005	40,57 ± 2,47
NLC <sub>i</sub> -CS 1% + PF 127 20% Glicerina	140,8 ± 1,2	0,278 ± 0,004	39,23 ± 0,23
NLC <sub>i</sub> -CS 1% + PF 127 20% D-Manitol	142,1 ± 2,2	0,357 ± 0,025	30,97 ± 0,95
NLC <sub>i</sub> -CS 1% + PF 127 20% Solução de Sorbitol 70%	140,4 ± 3,7	0,284 ± 0,001	41,67 ± 1,96
NLC <sub>i</sub> -CS 1% + PF 127 20% Propilenoglicol	143,2 ± 4,2	0,320 ± 0,030	42,13 ± 0,75

**Figura 67.** Efeito da adição de diferentes agentes isotonzantes às dispersões coloidais NLC<sub>i</sub>-CS 1% com e sem PF 127 20% (m/m) nos valores de Z-average, índice de polidispersão (PI) e potencial zeta (ZP). Os diferentes resultados foram expressos como média ± DP, realizados em triplicado. As comparações estatísticas foram efetuadas recorrendo ao Two-way ANOVA, seguido do *Tukey's multiple comparisons test* [**Z-ave** -

\*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001 vs. NLCi-CS 1% Original; #p<0,05; ##p<0,01 vs. NLCi-CS 1% + PF 127 20% Original; **PI** - \*\* p<0,01 vs. NLCi-CS 1% Original; #p<0,05; ##p<0,01 vs. NLCi-CS 1% + PF 127 20% Original; **ZP** - \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001 vs. NLCi-CS 1% Original; #####p<0,0001 vs. NLCi-CS 1% + PF 127 20% Original].

Como se pode verificar na Figura 67, através da aplicação da análise de variância, verifica-se que a glicerina foi o único agente isotonzante que não provocou alterações estatisticamente significativas no Z-ave das dispersões coloidais NLC<sub>i</sub>-CS 1% com e sem PF 127 20% (m/m). Pode-se também verificar que a adição da glicerina provocou uma diminuição estatisticamente significativa do PI da formulação NLC<sub>i</sub>-CS 1% e um aumento estatisticamente significativo do ZP da referida formulação, não se verificando alterações estatisticamente significativas nos valores do PI e do ZP das referidas formulações com o PF 127 20 % (m/m). A adição da glicerina como agente isotonzante beneficiou as propriedades físico-químicas das formulações oftálmicas, principalmente da formulação sem polímero PF 127.

Desta forma, conclui-se que a glicerina foi o agente isotonzante que causou menos alterações nas propriedades físico-químicas das nanopartículas lipídicas comparativamente com as formulações originais. Assim, e de acordo com os resultados obtidos, a glicerina foi o agente isotonzante escolhido para prosseguir os estudos.

#### 6.3.2.4 Avaliação do aspeto físico e da osmolalidade

De acordo com os resultados obtidos anteriormente, prepararam-se diferentes dispersões coloidais às quais foram adicionados hidrogéis com diferentes concentrações de quitosano (0,7; 1,0 e 1,3% m/m). Da mesma forma, prepararam-se dispersões idênticas às anteriores tendo sido adicionado a cada uma delas polímero termossensível PF 127 20% (m/m). Vinte e quatro horas depois da produção das diferentes dispersões coloidais, procedeu-se à análise do aspeto físico das mesmas. Verificou-se que as dispersões coloidais apresentavam um aspeto homogêneo, sem separação de fases e sem problemas de estabilidade visíveis. A isotonia das dispersões foi conseguida através da adição de diferentes quantidades de glicerina. A Tabela XXXII mostra os valores de osmolalidade das diferentes dispersões coloidais depois da adição de quantidade apropriada de agente isotonzante.

**Tabela XXXII.** Valores de Osmolalidade das diferentes dispersões coloidais preparadas (Média  $\pm$  DP, n=3).

Formulações	Quantidade de glicerina (m/m)	Valor de Osmolalidade (mOsm/kg)
NLC <sub>p</sub>	2,5	300,0 $\pm$ 10,0
NLC <sub>i</sub>	2,4	300,0 $\pm$ 0,0
NLC <sub>i</sub> -CS 0,7%	2,3	293,3 $\pm$ 5,8
NLC <sub>i</sub> -CS 1,0%	2,3	303,3 $\pm$ 5,8
NLC <sub>i</sub> -CS 1,3%	2,3	296,7 $\pm$ 5,8
NLC <sub>i</sub> -CS 0,7%+PF 127 20%	2,0	290,0 $\pm$ 0,0
NLC <sub>i</sub> -CS 1,0%+PF 127 20%	2,0	296,7 $\pm$ 5,8
NLC <sub>i</sub> -CS 1,3%+PF 127 20%	2,0	293,3 $\pm$ 5,8

Os valores de osmolalidade das diferentes formulações situaram-se entre 290-310 mOsm/kg, podendo concluir-se que todas as formulações eram isotónicas.

#### 6.3.2.5 Determinação da temperatura de transição de fase solução-gel

As temperaturas de transição sol-gel das dispersões NLC<sub>i</sub>-CS+PF 127 20% (m/m) preparadas com hidrogéis com diferentes percentagens de CS depois da diluição em fluido lacrimal artificial na proporção de 40:7 têm que ocorrer a valores inferiores a 35°C. A Tabela XXXIII mostra as temperaturas de transição sol-gel das dispersões NLC<sub>i</sub>-CS+PF 127 20% (m/m) preparadas com diferentes percentagens de CS.

**Tabela XXXIII.** Temperatura de transição sol-gel das diferentes dispersões NLC<sub>i</sub>-CS+PF 127 20% preparadas com diferentes percentagens de CS (Média  $\pm$  DP, n=3).

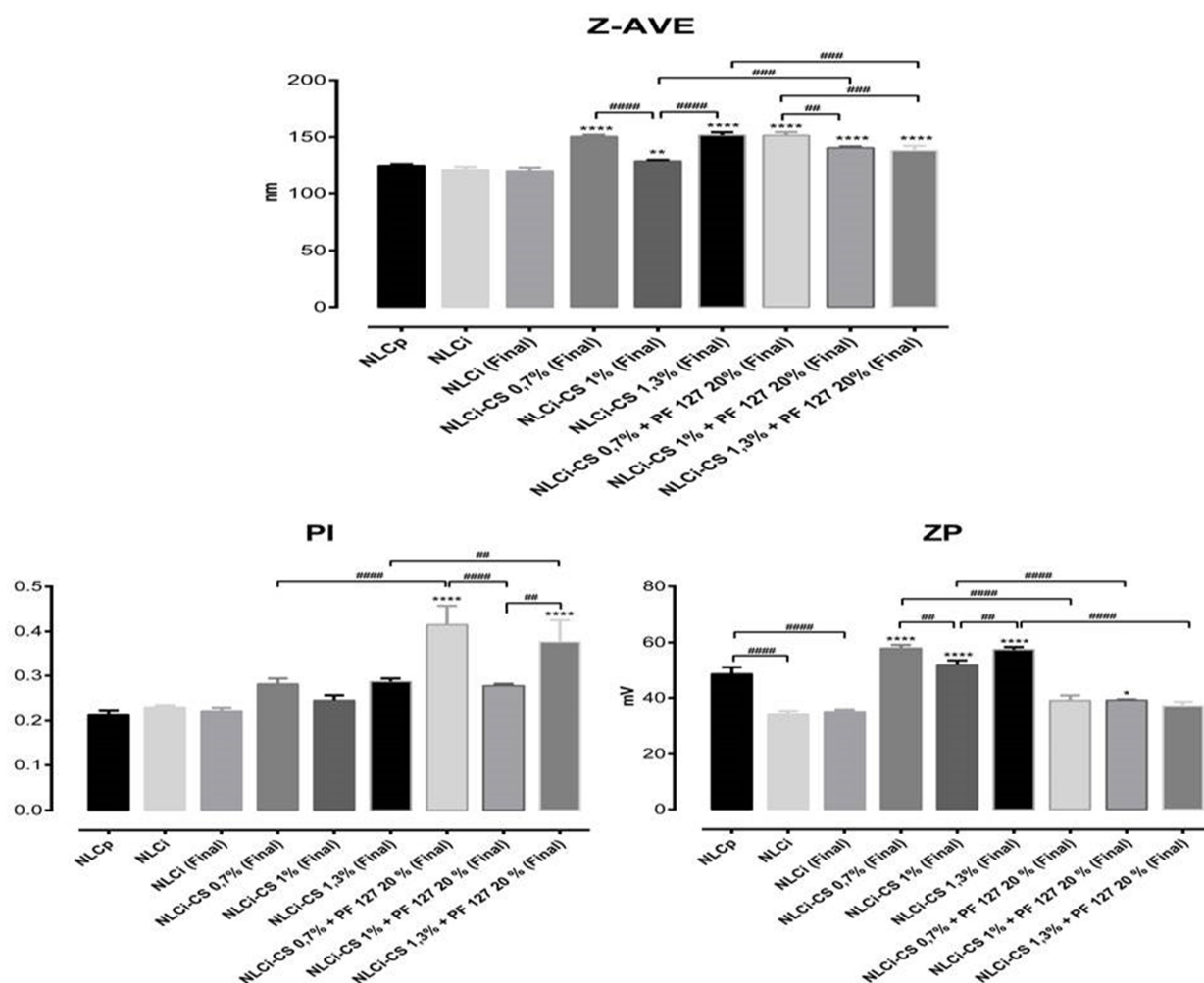
	NLC <sub>i</sub> -CS 0,7%+PF 127 20%	NLC <sub>i</sub> -CS 1%+PF 127 20%	NLC <sub>i</sub> -CS 1,3%+PF 127 20%
Formulação Original (°C)	20,0 $\pm$ 0,0	19,7 $\pm$ 0,6	19,3 $\pm$ 0,6
Depois de diluição em STF (°C)	29,3 $\pm$ 0,6	28,7 $\pm$ 0,6	28,0 $\pm$ 0,0

Como se pode ver na Tabela XXXIII, o aumento da percentagem de CS na dispersão coloidal causou uma ligeira diminuição da temperatura de transição sol-gel. Todas as formulações testadas apresentaram temperaturas de transição sol-gel abaixo

de 35°C. De acordo com os resultados obtidos, todas as formulações estudadas terão capacidade de gelificar em condições fisiológicas.

#### 6.3.2.6 Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta

A Figura 68 mostra os resultados de Z-average, índice de polidispersão (PI) e potencial zeta (ZP) das dispersões NLC contendo diferentes percentagens de CS, 8 dias após a sua preparação usando a técnica de dispersão dinâmica da luz (DLS).



Formulações originais	Z-Ave (nm)	PI	ZP (mV)
NLC <sub>p</sub>	125,4 ± 1,3	0,213 ± 0,011	48,50 ± 2,36
NLC <sub>i</sub>	121,3 ± 2,9	0,231 ± 0,004	34,13 ± 1,24
<b>Formulações isotônicas</b>			
NLC <sub>i</sub>	120,0 ± 3,7	0,223 ± 0,007	35,13 ± 0,76
NLC <sub>i</sub> -CS 0,7%	150,6 ± 1,4	0,282 ± 0,012	57,97 ± 1,15
NLC <sub>i</sub> -CS 1,0%	129,4 ± 0,9	0,246 ± 0,011	52,00 ± 1,66
NLC <sub>i</sub> -CS 1,3%	151,7 ± 2,5	0,287 ± 0,007	57,43 ± 0,93
NLC <sub>i</sub> -CS 0,7% + PF 127 20%	151,5 ± 2,9	0,415 ± 0,042	39,07 ± 1,82
NLC <sub>i</sub> -CS 1,0% + PF 127 20%	140,8 ± 1,2	0,278 ± 0,004	39,23 ± 0,23
NLC <sub>i</sub> -CS 1,3% + PF 127 20%	138,5 ± 3,9	0,377 ± 0,048	37,20 ± 1,41

**Figura 68.** Valores de Z-ave, índice de polidispersão (PI) e potencial zeta (ZP) das diferentes dispersões NLC. Os diferentes resultados foram expressos como média ± DP, realizados em triplicado. As comparações estatísticas foram efetuadas utilizando o teste One-way ANOVA, seguido pelo *Tukey's multiple comparisons test* [**Z-ave** -\*\* p<0,01; \*\*\*\* p<0,0001 vs. NLC<sub>i</sub> (final); ##p<0,01; ###p<0,001; ####p<0,0001; **PI** - \*\*\*\* p<0,0001 vs. NLC<sub>i</sub>

(final); <sup>##</sup>p<0.01; <sup>####</sup>p<0,0001; **ZP** - \* p<0,05; <sup>\*\*\*\*</sup> p<0,0001 vs. NLC<sub>i</sub> (final); <sup>##</sup>p<0,01; <sup>####</sup>p<0,0001].

Como referido anteriormente, de forma a evitar qualquer tipo de irritação e desconforto ocular após a administração tópica de uma formulação oftálmica e de forma a promover a mucoadesão e a penetração através dos tecidos oculares, as nanopartículas lipídicas devem apresentar um diâmetro inferior a 400 nm [32,39,45,46,81,267,272]. Como demonstra a Figura 68, os NLC produzidos com recurso à técnica de emulsificação seguida de ultrasonicação apresentaram propriedades físico-químicas adequadas para serem administrados sob a forma de colírio. Realça-se que outros autores, utilizando a mesma técnica de produção de NLC, obtiveram NLC com propriedades físico-químicas similares [274,276,316,319]. Os NLC produzidos apresentaram um Z-ave de cerca de 120 nm, com um índice de polidispersão (PI) de 0,23 e um valor de potencial zeta (ZP) de + 34,1 mV. Tanto a simples adição do polímero CS, como a adição conjunta dos polímeros CS e PF 127 à dispersão coloidal NLC<sub>i</sub> provocou um aumento do valor de Z-ave. Através da aplicação da análise de variância, verifica-se que a simples adição do hidrogel com diferentes concentrações de CS à dispersão coloidal ou a adição do hidrogel de CS e do PF 127 20 % (m/m) à dispersão coloidal provocou um aumento estatisticamente significativo do valor de Z-ave. Este aumento do tamanho das NLC<sub>i</sub> deve-se ao facto dos referidos polímeros se fixarem à superfície das nanopartículas, tornando-as mais volumosas.

Os valores de índice de polidispersão (PI) das diferentes dispersões coloidais sem a adição de PF 127 foram sempre inferiores a 0,3, o que demonstra que estamos na presença de monodispersões, com uma população de tamanhos homogénea, com pouca variabilidade, sem micropartículas ou fenómenos de agregação [39,272,314,319]. A adição de PF 127 às dispersões coloidais provocou em alguns casos o aumento do índice de polidispersão acima dos 0,3, facto provocado pela fixação da rede polimérica do polímero termossensível à superfície dos NLC.

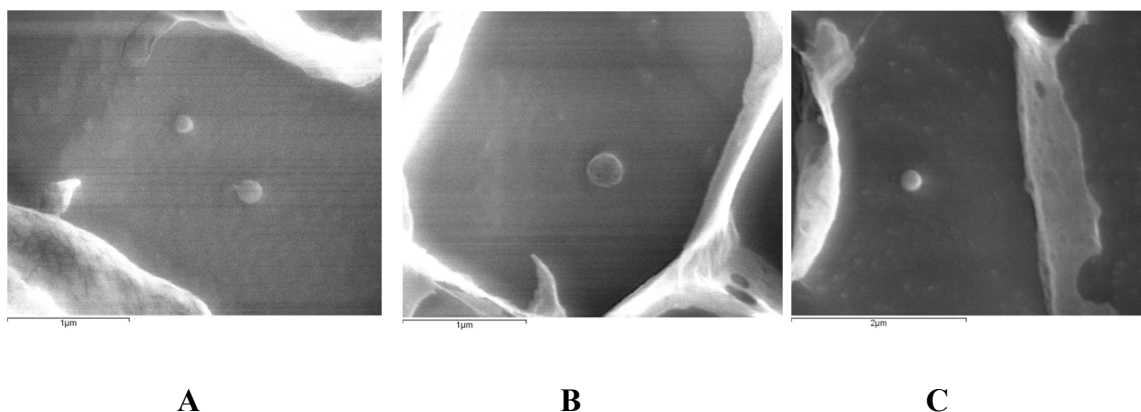
Os valores de potencial zeta (ZP) das diferentes dispersões coloidais preparadas foi sempre superior a + 30 mV. As dispersões coloidais com esta carga elétrica de superfície são consideradas fisicamente estáveis, isto porque a repulsão eletrostática que se verifica entre as nanopartículas evita fenómenos de agregação ou precipitação [174,271,272,314,318]. Além disso, a carga elétrica positiva que se verifica à superfície das nanopartículas lipídicas permite que estas possam estabelecer interações eletrostáticas com as cargas elétricas negativas existentes nos tecidos oculares, devidas essencialmente à mucina, aumentando desta forma o tempo de residência pré-corneal



das formulações oftálmicas [25,43,81,278,281,346]. Como era de esperar, a adição do CS, um polímero catiónico, à dispersão coloidal, causou aumento do valor do potencial zeta da mesma, estando este resultado de acordo com os obtidos por outros autores [11,23,29]. Através da aplicação da análise de variância, verifica-se que a adição dos hidrogéis de CS às dispersões coloidais provocou um aumento estatisticamente significativo do valor de ZP. A adição do polímero termossensível não iónico PF 127 às dispersões coloidais provocou a diminuição da carga elétrica de superfície das NLC<sub>i</sub>-CS. Este facto acontece porque a rede polimérica se fixa à superfície das NLC, mascarando ou encobrindo as cargas elétricas existentes.

#### 6.3.2.7 Determinação da morfologia das nanopartículas por microscopia eletrónica de varrimento de alta resolução a baixa temperatura (cryoSEM)

A Figura 69 mostra a morfologia de superfície e o tamanho dos diferentes NLC preparados.



**Figura 69.** Imagens de CryoSEM das diferentes dispersões: NLC<sub>i</sub> (A), NLC<sub>i</sub>-CS 1% (B) e (C) (ampliação de 40000x).

De acordo com a Figura 69 verifica-se que, nas áreas observadas não foi possível visualizar qualquer tipo de fenómenos de agregação. Os tamanhos dos diferentes NLC produzidos estão de acordo com os resultados obtidos pela técnica de DLS. A adição do hidrogel de CS às dispersões coloidais não causou alterações significativas na morfologia de superfície e no tamanho médio dos NLC. Com recurso a esta técnica, não foi possível observar a amostra NLC<sub>i</sub>-CS 1%+PF 127 20% devido à elevada concentração deste polímero adicionado à dispersão coloidal. A elevada densidade da rede polimérica não permitiu a observação das nanopartículas lipídicas.

### 6.3.2.8 Determinação da eficácia de encapsulação e da capacidade de carga dos NLC

#### 6.3.2.8.1 Validação do método de doseamento do ibuprofeno

##### 6.3.2.8.1.1 Estudo da linearidade da resposta do detetor

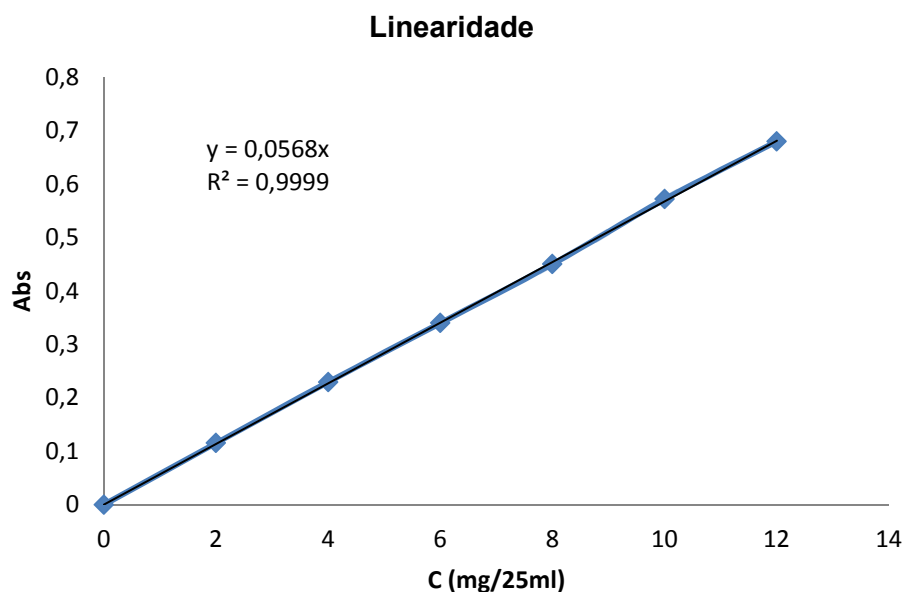
Antes de se proceder à avaliação da eficácia de encapsulação do ibuprofeno nas NLC foi efetuada a validação do método de doseamento. Desta forma, para efetuar o estudo da linearidade da resposta do detetor foram preparadas 6 soluções padrão de ibuprofeno em solução tampão fosfato pH 7,4 com as seguintes concentrações: 20% (2 mg/25 mL), 40% (4 mg/25 mL), 60% (6 mg/25 mL), 80% (8 mg/25 mL), 100% (10 mg/25 mL) e 120% (12 mg/25 mL).

Na Tabela XXXIV são apresentados os valores da absorvência obtidos para cada uma das concentrações padrão preparadas.

**Tabela XXXIV.** Valores das absorvências lidas para o estudo de linearidade da resposta do detetor do método de doseamento espectrofotométrico do ibuprofeno.

C (%)	C (mg/25 mL)	Abs (272 nm)
0	0	0
20	2	0,1155
40	4	0,2296
60	6	0,3401
80	8	0,4504
100	10	0,5718
120	12	0,6800

A Figura 70 ilustra a representação gráfica dos valores das absorvências lidas em função das concentrações padrão de ibuprofeno.



**Figura 70.** Representação gráfica da reta de calibração relativa ao estudo da linearidade da resposta do detector do método de doseamento espectrofotométrico do ibuprofeno.

A partir desta representação gráfica determinou-se o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), os valores da ordenada na origem e o declive da reta. O coeficiente de determinação foi de 0,9999, concluindo-se desta forma, que existe uma correlação linear entre as absorvências lidas e as diferentes soluções padrão de ibuprofeno.

#### 6.3.2.8.1.2 Estudo da precisão

Os estudos da precisão basearam-se na determinação da repetibilidade e, para isso, procedeu-se à leitura da absorvência de 6 amostras da solução padrão de ibuprofeno com uma concentração de 100%, ou seja, 10 mg/25 mL. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela XXXV.

**Tabela XXXV.** Avaliação da repetibilidade do método de doseamento espectrofotométrico do ibuprofeno.

<b>Amostra</b>	<b>Valor de Abs lido</b>
1	0,5718
2	0,5689
3	0,5680
4	0,5700
5	0,5714
6	0,5718
<b>Média</b>	<b>0,5703</b>
<b>DP</b>	<b>0,0016</b>
<b>CV (%)</b>	<b>0,2833</b>

Este método apresentou um desvio padrão de 0,0016 e um coeficiente de variação de 0,2833 %. Como o coeficiente de variação é inferior a 2%, concluiu-se que o método é preciso no que diz respeito à repetibilidade.

#### 6.3.2.8.1.3 Estudo da exatidão

Na Tabela XXXVI estão representados os resultados do estudo de exatidão.

**Tabela XXXVI.** Avaliação da exatidão do método de doseamento espectrofotométrico do ibuprofeno.

<b>Conc. teórica (mg/25 mL)</b>	<b>Abs. Lida</b>	<b>Conc. Lida (mg/25 mL)</b>	<b>Recuperação de Ibuprofeno (%)</b>
2	0,1155	2,03	101,67
4	0,2296	4,04	101,06
6	0,3401	5,99	99,79
8	0,4504	7,93	99,12
10	0,5718	10,07	100,67
12	0,6800	11,97	99,77
		<b>Média</b>	<b>100,35</b>
		<b>DP</b>	<b>0,95</b>
		<b>CV (%)</b>	<b>0,95</b>

Os valores da recuperação do ibuprofeno são muito próximos de 100%, sendo assim podemos concluir que o método é exato.

#### 6.3.2.8.1.4 Especificidade

Verificou-se que os restantes excipientes apresentaram uma ligeira absorvência a 272 nm. Desta forma, concluiu-se que este método não apresenta especificidade para o ibuprofeno quando incorporado nas formulações descritas.

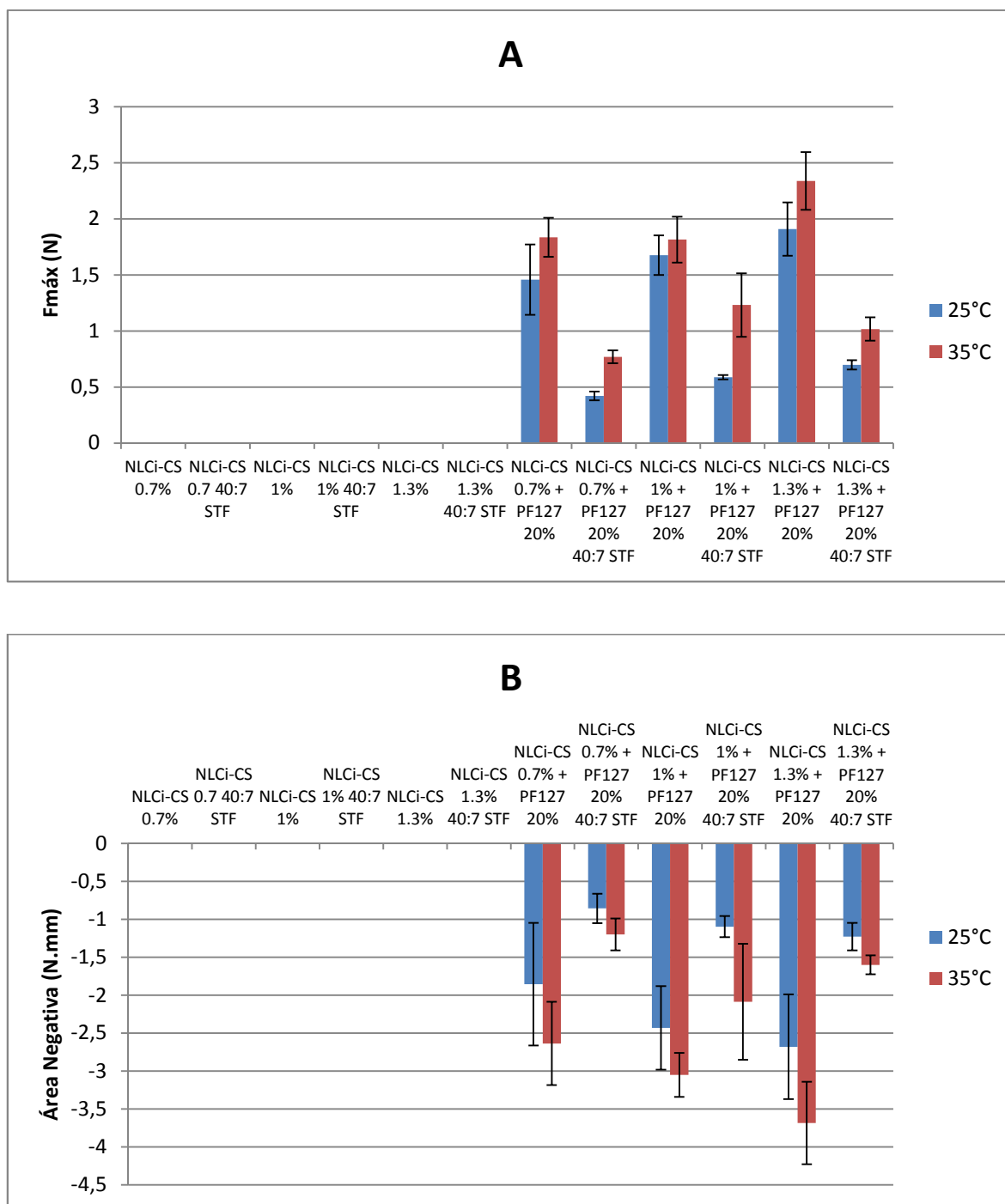
No entanto, o método de doseamento espectrofotométrico do ibuprofeno demonstrou ser linear na gama de concentrações utilizadas, preciso (em termos de repetibilidade) e exato, podendo ser utilizado para o doseamento do ibuprofeno encapsulado nos NLC, após a subtração dos valores das absorvências das soluções contendo todos os componentes da fórmula, à exceção do fármaco.

#### 6.3.2.8.2 Resultados da eficácia de encapsulação e da capacidade de carga das NLC

A eficácia de encapsulação (EE) dos NLC<sub>i</sub> foi de  $81,68 \pm 2,40\%$  com uma capacidade de carga (LC) de  $1,63 \pm 0,05\%$ . Os valores elevados de eficácia de encapsulação obtidos confirmam a solubilidade, compatibilidade e miscibilidade entre os lípidos escolhidos e o ibuprofeno. Estes valores confirmam também que o método de produção selecionado e as respetivas variáveis foram as mais indicadas, promovendo a encapsulação do ibuprofeno [276].

#### 6.3.2.9 Análise dos parâmetros de textura antes e após a diluição em fluido lacrimal artificial

A Figura 71 exhibe os resultados da avaliação dos parâmetros de textura das diferentes dispersões NLC<sub>i</sub>-CS e NLC<sub>i</sub>-CS+PF127 20% preparadas com e sem diluição em fluido lacrimal artificial, a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ .



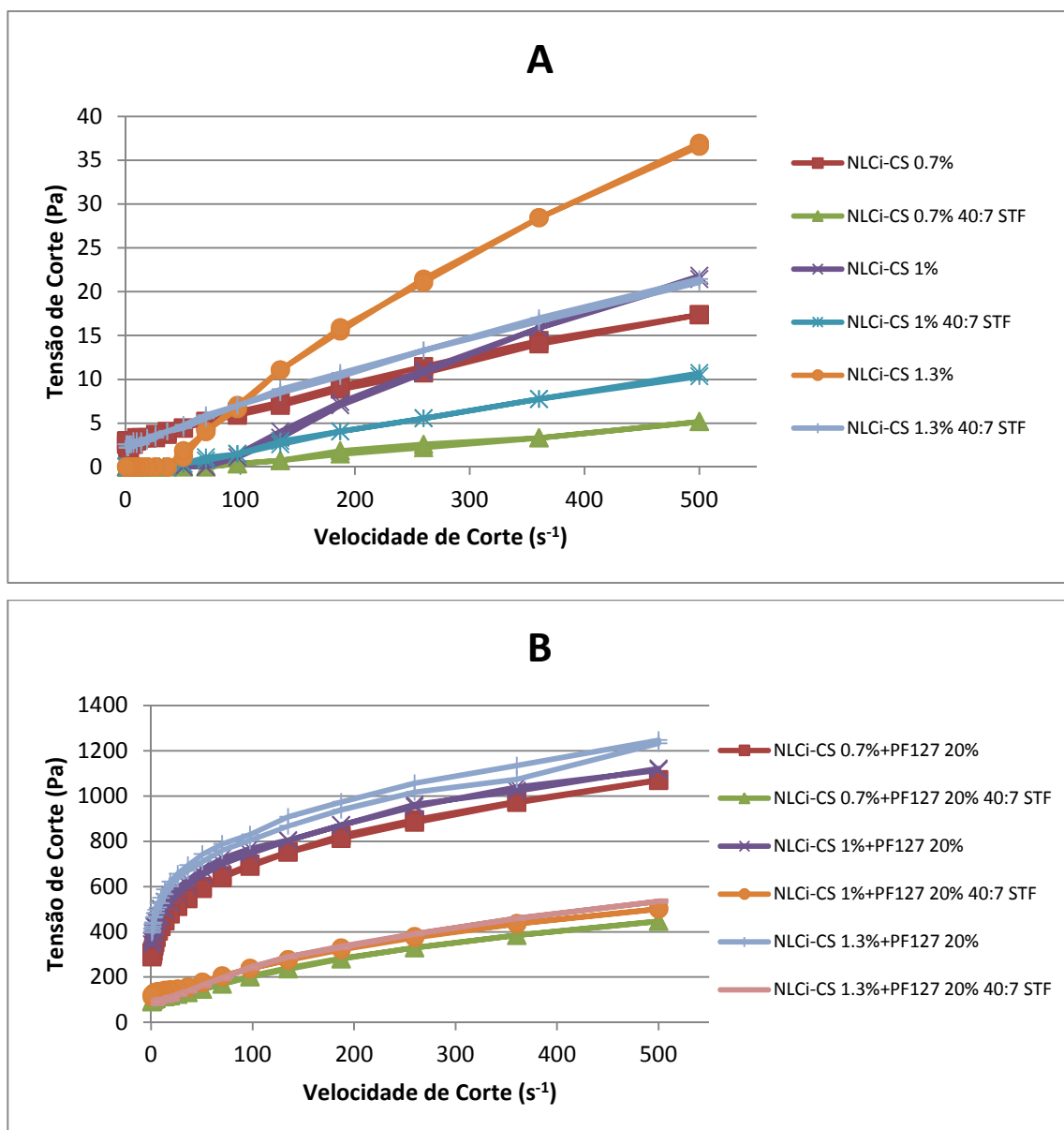
**Figura 71.** Firmeza (Fmáx.) **(A)** e Adesividade (Área negativa) **(B)** das dispersões NLC<sub>i</sub>-CS com e sem polímero termossensível PF 127, com e sem diluição em STF, a 25±2°C e a 35±2°C (Média ± DP, n=3).

A Figura 71 mostra que as diferentes dispersões NLC<sub>i</sub>-CS antes e depois da diluição em fluido lacrimal artificial não exibiram valores de firmeza e adesividade mensuráveis, independentemente da temperatura usada no ensaio. A incorporação do

polímero termossensível PF 127 numa percentagem de 20% (m/m) nas diferentes dispersões NLC<sub>i</sub>CS fez com que estas formulações apresentassem valores de firmeza e adesividade quantificáveis. O aumento temperatura de 25°C para 35°C causou um aumento nos valores da firmeza e da adesividade das dispersões coloidais com ou sem diluição em fluido lacrimal artificial. Este comportamento foi observado por diferentes autores [103,156,391]. A explicação para este fenómeno já foi referida anteriormente. No entanto, no caso das amostras sem diluição as diferenças entre os valores dos parâmetros de textura a 25°C e a 35°C não foram significativas. Como seria de esperar, a diluição das dispersões NLC<sub>i</sub>CS+PF 127 20% em fluido lacrimal artificial causou uma diminuição dos valores da firmeza e da adesividade para cerca de metade dos valores obtidos sem diluição. O aumento da percentagem de CS nas formulações causou apenas um ligeiro aumento nos valores da firmeza e da adesividade, sendo mais significativo no caso das amostras diluídas com fluido lacrimal.

#### 6.3.2.10 Análise reológica antes e após a diluição em fluido lacrimal artificial

A Figura 72 mostra os reogramas das diferentes dispersões NLC<sub>i</sub>CS e NLC<sub>i</sub>CS+PF 127 20% preparadas com diferentes concentrações de CS, com e sem diluição em fluido lacrimal artificial na proporção de 40:7, cuja avaliação foi realizada à temperatura de 35±0,5°C.



**Figura 72.** Reogramas das dispersões NLC<sub>i</sub>-CS sem **(A)** e com PF 127 20% (m/m) **(B)**, com e sem diluição em STF na proporção de 40:7, à temperatura de 35±0,5°C.

A reduzida viscosidade das dispersões coloidais faz com que este tipo de formulações seja rapidamente eliminada pelos mecanismos de defesa do globo ocular. Desta forma, com vista a aumentar o tempo de retenção das dispersões coloidais na superfície ocular, os autores Gupta *et al.* (2013) [303] e Gupta *et al.* (2013) [304] adicionaram às dispersões coloidais o quitosano, polímero sensível ao pH e com propriedades mucoadesivas, enquanto que, os autores Hao *et al.* (2014) [344] adicionaram os Poloxâmeros 407 e 188, polímeros termossensíveis. Estes autores conseguiram aumentar a viscosidade das formulações oftálmicas, uma vez que, estes

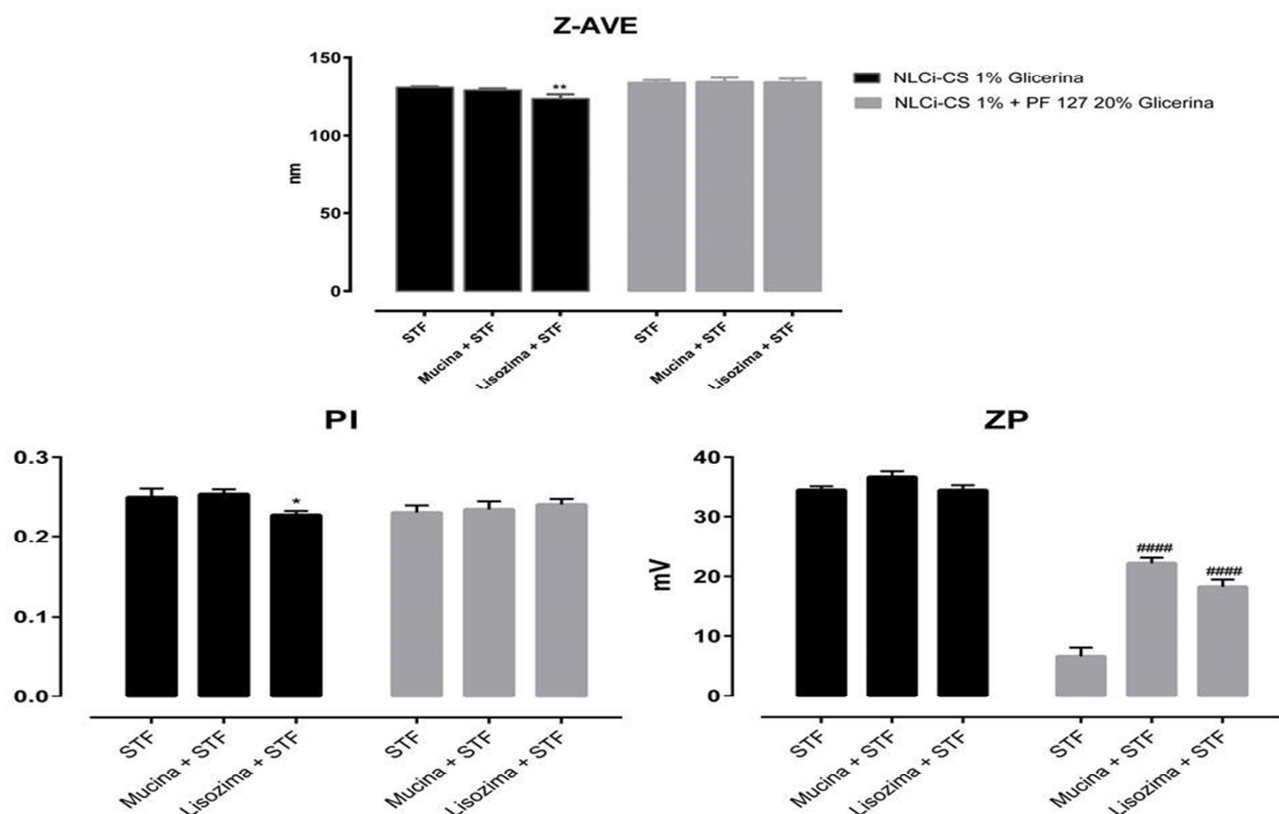


polímeros ao entrarem em contacto com o pH ou com a temperatura da superfície ocular, sofrem uma transição sol-gel, aumentando assim a eficácia terapêutica das formulações oftálmicas desenvolvidas. Assim, neste estudo, como forma de ultrapassar a baixa viscosidade das dispersões coloidais de NLC foram adicionados dois polímeros, o CS (polímero sensível ao pH e com características mucoadesivas) e o PF 127 (polímero termossensível). As dispersões coloidais só com CS antes e após a diluição apresentaram comportamentos reológicos muito próximos do Newtoniano. As formulações com PF 127 antes da diluição apresentaram comportamento não-Newtoniano plástico e sem tixotropia. As dispersões coloidais com polímero PF 127 com diluição em fluido lacrimal artificial exibiram um comportamento aparentemente pseudoplástico e sem tixotropia. Como já foi referido anteriormente este comportamento oferece uma menor resistência ao movimento ocular e ao pestanejar, não causando qualquer tipo de desconforto ou irritação ocular [32,38]. Além disso, após a diluição observou-se um decréscimo da tensão de corte máxima para cerca de metade ( $< 600$  Pa) dos valores obtidos antes da diluição ( $> 1000$  Pa), estando estes resultados em concordância com os obtidos nos ensaios de textura. Como seria de esperar, a adição do polímero CS à dispersão coloidal ou a adição conjunta dos polímeros CS e PF 127 provocou um aumento da viscosidade das dispersões coloidais. Contudo, a diluição das diferentes dispersões coloidais em fluido lacrimal artificial causou uma diminuição bastante significativa da viscosidade das formulações.

#### 6.3.2.11 Estudos da interação com a lisozima e com a mucina

##### 6.3.2.11.1 Avaliação da estabilidade das dispersões coloidais na presença de fluido lacrimal artificial e na presença de fluido lacrimal artificial com mucina ou lisozima

Os fluidos biológicos apresentam muitas enzimas e proteínas com diferentes funções fisiológicas. Por esta razão, é muito importante estudar a estabilidade das dispersões coloidais desenvolvidas na presença dos componentes principais dos tecidos oculares: a mucina e a lisozima [243,297]. Desta forma, as propriedades físico-químicas (Z-ave, PI e ZP) das diferentes dispersões coloidais NLC<sub>i</sub>-CS 1% e NLC<sub>i</sub>-CS 1%+PF 127 20% incubadas em fluido lacrimal artificial pH 7,4, em solução de mucina 0,4 mg/mL em fluido lacrimal artificial pH 7,4 e em solução de lisozima 1,0 mg/mL em fluido lacrimal artificial pH 7,4 estão resumidas na Figura 73.



	Branco (misturado com STF pH 7,4)			Solução de Mucina 0,4 mg/mL + STF pH 7,4			Solução de Lisozima 1,0 mg/mL + STF pH 7,4		
	Z-Ave (nm)	PI	ZP (mV)	Z-Ave (nm)	PI	ZP (mV)	Z-Ave (nm)	PI	ZP (mV)
<b>NLC<sub>i</sub>-CS 1% Glicerina</b>	130,5 ± 0,5	0,249 ± 0,011	34,40 ± 0,62	128,7 ± 1,0	0,253 ± 0,006	36,57 ± 0,93	123,3 ± 2,7	0,227 ± 0,005	34,37 ± 0,81
<b>NLC<sub>i</sub>-CS 1%+PF 127 20% Glicerina</b>	133,5 ± 1,6	0,230 ± 0,009	6,61 ± 1,47	134,1 ± 2,7	0,234 ± 0,010	22,13 ± 0,93	133,9 ± 2,2	0,240 ± 0,007	18,27 ± 1,19

**Figura 73.** Efeito da adição de fluido lacrimal artificial (STF) pH 7,4 com e sem mucina 0,4 mg/mL ou lisozima 1,0 mg/mL nos valores de Z-ave, índice de polidispersão (PI) e potencial zeta (ZP) das dispersões coloidais NLCi-CS 1 % e NLCi-CS 1%+PF 127 20% isotonzadas com glicerina. Os resultados estão expressos como media ± SD (realizado em triplicado). As comparações estatísticas foram efetuadas utilizando o teste Two-way ANOVA, seguido pelo *Tukey's multiple comparisons test* [**Z-ave** - \*\* p<0,01 vs. NLCi-CS 1% Glicerina + STF; **PI** - \* p<0,05 vs. NLCi-CS 1% Glicerina + STF; **ZP** - #### p<0,0001 vs. NLCi-CS 1% + PF 127 Glicerina+ STF].

A incubação das nanopartículas lipídicas com a solução de lisozima, uma proteína catiônica, em fluido lacrimal artificial causou alterações estatisticamente significativas nas propriedades físico-químicas do Z-ave e do PI da dispersão NLC<sub>i</sub>-CS 1%, diminuindo o valor destas propriedades físico-químicas, causando por outro lado, um aumento estatisticamente significativo no valor de ZP da dispersão coloidal NLC<sub>i</sub>-CS 1% + PF 127

20 %, quando comparados com o branco (STF). Da mesma forma conclui-se que a integridade e as propriedades físico-químicas das diferentes dispersões coloidais não foram substancialmente afetadas pela lisozima presente no fluido lacrimal [243,297,399]. Este comportamento já tinha sido reportado por outros autores [243,297].

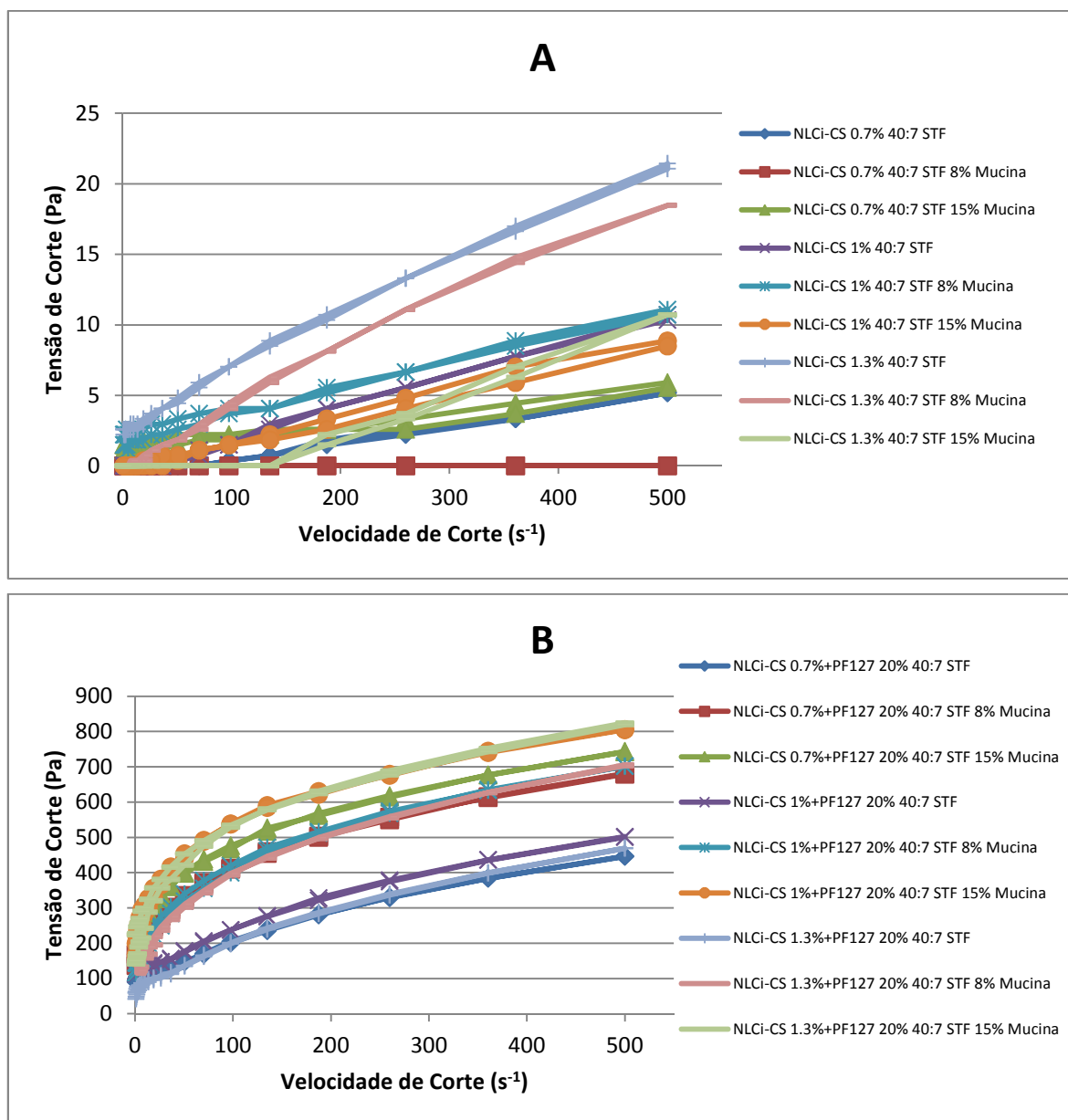
A incubação das dispersões NLC<sub>i</sub> com a solução de mucina em fluido lacrimal artificial não causou diferenças significativas nos valores de Z-ave, no índice de polidispersão (PI) e nos valores de potencial zeta (ZP) nas dispersões coloidais NLC<sub>i</sub>-CS 1% quando comparadas com o branco. No entanto, verificou-se um aumento estatisticamente significativo do valor de ZP na dispersão coloidal NLC<sub>i</sub>-CS 1% + PF 127 20 % quando comparado com o branco (STF). Campos *et al.* (2004) [243] nos seus estudos registaram uma pequena diminuição dos valores do potencial zeta (ZP) na presença de uma solução de mucina, enquanto Silva *et al.* (2015) [297] registaram mudanças significativas nos valores do potencial zeta (ZP) das nanopartículas lipídicas na presença de solução de mucina. Contudo, nestes estudos, os autores usaram nanopartículas poliméricas preparadas com quitosano e não nanopartículas lipídicas incorporadas num hidrogel de quitosano. Esta pequena diferença pode explicar os diferentes resultados obtidos.

Em conclusão, a incubação das diferentes dispersões coloidais em solução de mucina ou em solução de lisozima não provocou alterações significativas nas propriedades físico-químicas e na integridade das nanopartículas lipídicas.

#### 6.3.2.11.2 Estudos de mucoadesão na presença de fluido lacrimal artificial com mucina

##### 6.3.2.11.2.1 Análise reológica das formulações diluídas em fluido lacrimal artificial contendo mucina

A Figura 74 ilustra os reogramas das diferentes dispersões NLC<sub>i</sub>-CS e NLC<sub>i</sub>-CS+PF127 20% preparadas com diferentes concentrações de CS diluídas em solução de fluido lacrimal artificial com 8 e 15% (m/m) de mucina, na proporção de 40:7 a uma temperatura de 35±0,5°C.



**Figura 74.** Reogramas das dispersões NLC<sub>i</sub>-CS sem **(A)** e com adição de PF 127 20% (m/m) **(B)**, com diluição em STF com 8% (m/m) e 15% (m/m) de mucina, na proporção de 40:7, a uma temperatura de 35±0,5°C.

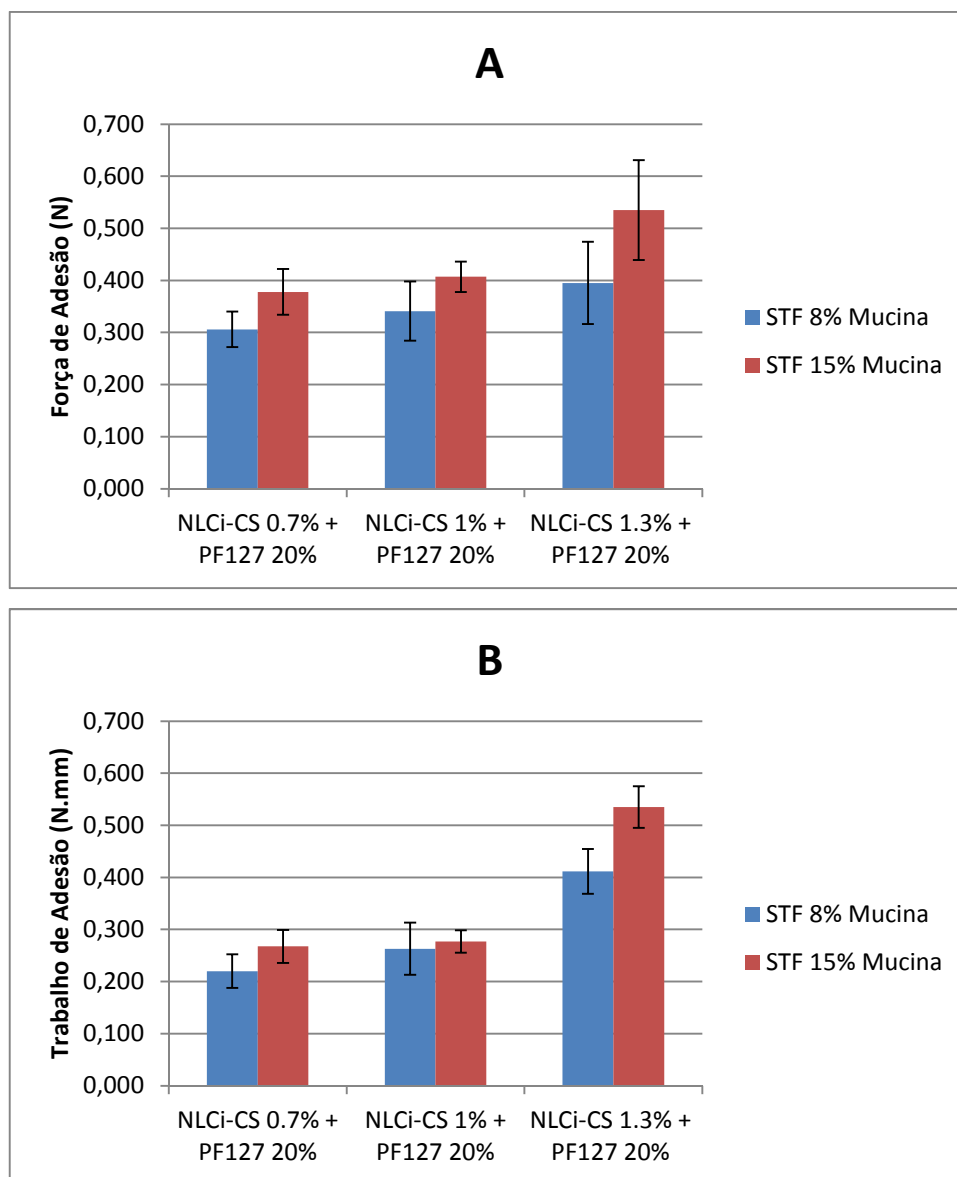
O quitosano (CS) é um polímero mucoadesivo policatiónico que possui a capacidade de sofrer uma transição sol-gel a valores de pH registados nos tecidos oculares, tendo também a capacidade de estabelecer pontes de hidrogénio e interações eletrostáticas entre os grupos amina positivamente carregados do quitosano e os resíduos de ácido siálico carregados negativamente da mucina [11,38,177,213,242,243,297]. A incubação das diferentes dispersões coloidais NLC<sub>i</sub>-CS em soluções de fluido lacrimal artificial com 8 ou 15% (m/m) de mucina na proporção de 40:7 provocou o aparecimento de alguns grânulos visíveis devido ao estabelecimento de

ligações entre o quitosano presente nas diferentes dispersões coloidais e a mucina presente no fluido lacrimal artificial. Este facto provocou uma diminuição da viscosidade das diferentes formulações como é possível verificar nos reogramas da Figura 74 (A). Como se pode verificar, este efeito é tanto maior quanto maior é a quantidade de mucina presente no fluido lacrimal artificial.

Por outro lado, a adição do polímero termossensível PF 127 20% (m/m) às dispersões coloidais, promove a formação de uma rede polimérica, evitando a formação dos grânulos, sendo que neste caso a presença da mucina no fluido lacrimal artificial provoca o aumento na viscosidade das diferentes formulações (Figura 74 (B)). Tal como esperado, no caso das formulações com PF 127 o aumento da quantidade de quitosano ou o aumento da quantidade de mucina presente no fluido lacrimal provocou o aumento da viscosidade das formulações. O mesmo comportamento foi descrito por Nagarwal *et al.* (2012) [295]. Nos seus estudos estes autores demonstraram que o CS estabelece interações com a mucina, aumentando desta forma a viscosidade das formulações, provocando um aumento do tempo de residência pré-corneal e por consequência o aumento da biodisponibilidade da formulação ocular.

#### 6.3.2.11.2.2 Determinação da força e do trabalho de adesão

A força e o trabalho de adesão foram determinados usando um texturómetro equipado com um dispositivo de mucoadesividade. A Figura 75 mostra a força e o trabalho de adesão das diferentes dispersões NLC<sub>i</sub>-CS+PF127 20% preparadas com diferentes quantidades de quitosano, diluídas em solução de fluido lacrimal artificial com 8 e 15% (m/m) de mucina, na proporção de 40:7 a uma temperatura de 35±2°C.



**Figura 75.** Força de Adesão **(A)** e Trabalho de Adesão **(B)** da dispersão NLC<sub>i</sub>-CS+PF 127 20% (m/m), com diluição em STF com 8% (m/m) e 15% (m/m) de mucina, na proporção de 40:7 a uma temperatura de 35±2°C.

De realçar que não foi possível executar este tipo de ensaio com as formulações sem PF 127, uma vez que a amostra (100 mg) ao ser colocada na sonda escorria quando esta era invertida devido ao facto da amostra ser muito líquida, não permitindo a correta execução do ensaio. Este facto não aconteceu com as dispersões NLC<sub>i</sub>-CS+PF127 20%, uma vez que, as amostras apresentavam consistência semissólida a 35±2°C.

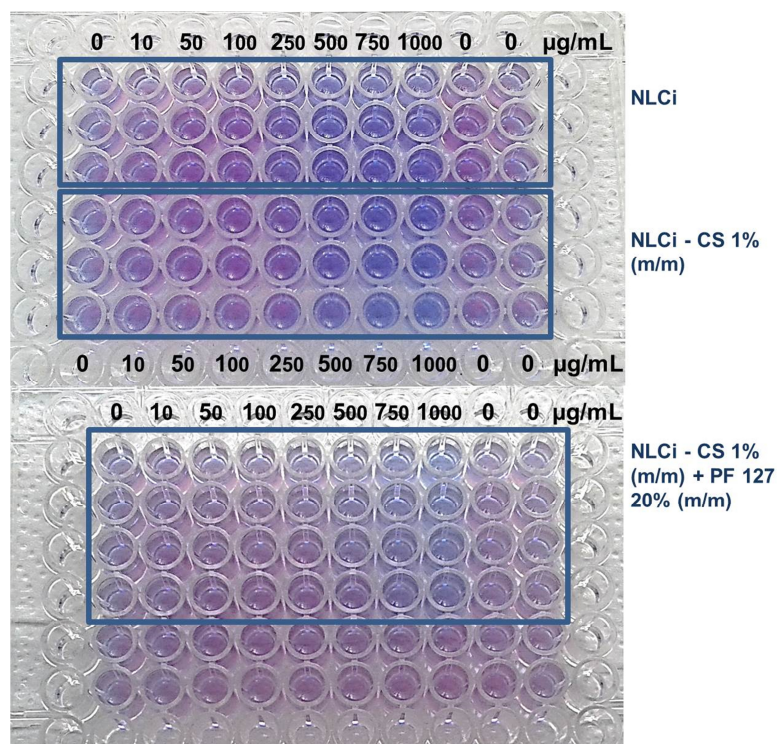
Como seria de esperar, o aumento da quantidade de CS na dispersão coloidal e o aumento da quantidade de mucina no fluido lacrimal artificial aumentou tanto a força de adesão como o trabalho de adesão. Como já foi referido anteriormente, este tipo de

interações promove um aumento do tempo de residência das formulações oftálmicas na zona pré-corneal [11,38,177,242,243,297].

Estes resultados confirmaram os obtidos nos ensaios reológicos executados anteriormente. Os autores Peh *et al.* (2000) [400] concluíram nos seus estudos que a adição do quitosano à forma farmacêutica provocava um aumento do trabalho de adesão.

#### 6.3.2.12 Estudos de biocompatibilidade: Ensaio da redução do Alamar Blue

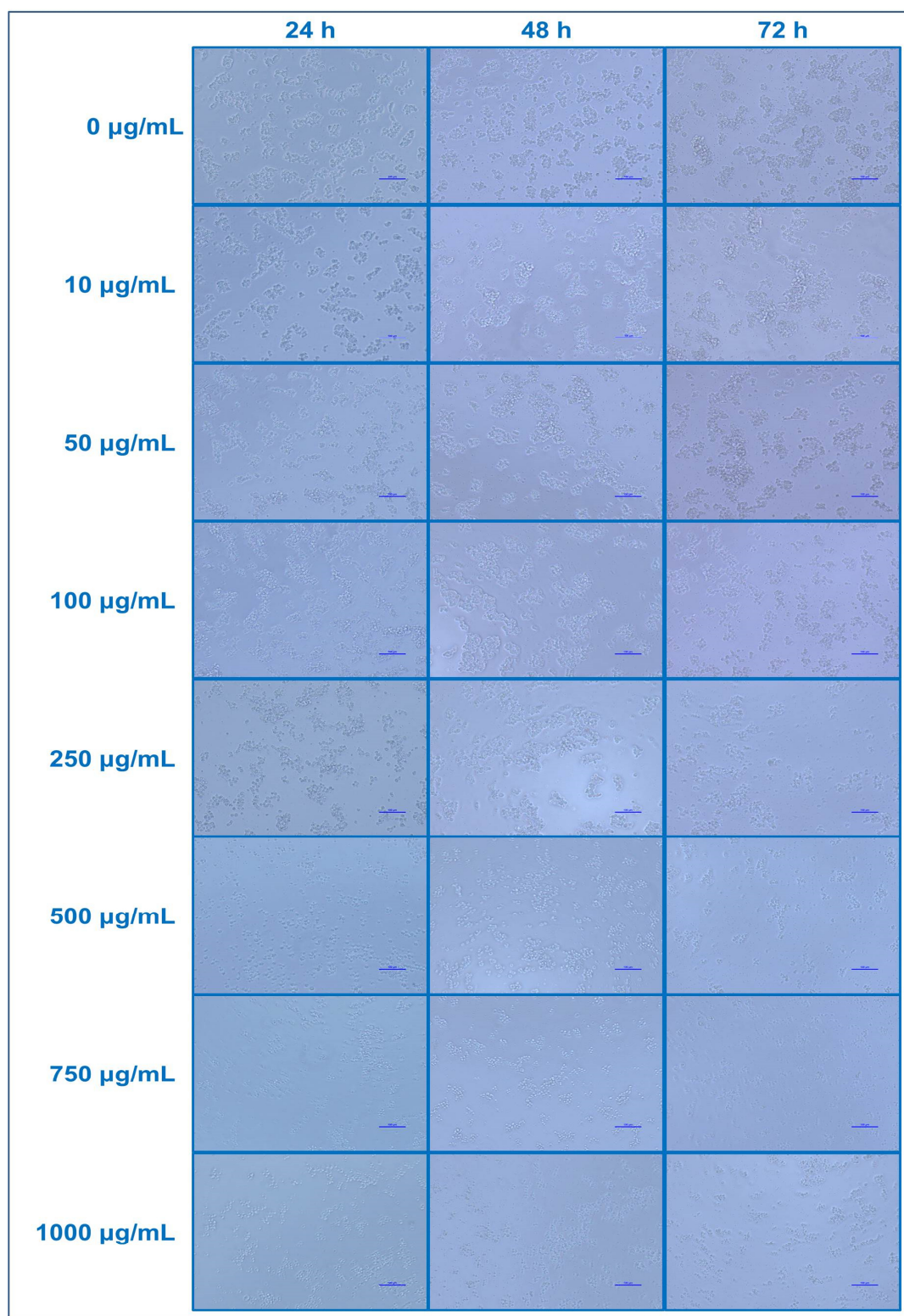
No presente estudo, a citotoxicidade das diferentes formulações oftálmicas desenvolvidas foi determinada a diferentes concentrações e a diferentes tempos de incubação, utilizando o ensaio da redução do reagente Alamar Blue e a linha celular do retinoblastoma humano Y-79 com modelo *in vitro*. Como já foi referido, este ensaio baseia-se na habilidade das células metabolicamente ativas em converter o reagente Alamar Blue num indicador fluorescente e colorimétrico. Desta forma, o resultado do ensaio fornece uma análise quantitativa da viabilidade e da proliferação celular após exposição a um determinado composto. As células lesadas ou não viáveis apresentam uma atividade metabólica reduzida ou nula, gerando, por consequência, um sinal fluorescente ou colorimétrico proporcionalmente menor, permitindo assim uma avaliação do potencial de citotoxicidade das formulações alvo de teste. A título exemplificativo, a Figura 76 ilustra o resultado final do ensaio de redução do Alamar Blue em células Y-79, 72 horas após a exposição às formulações NLCi, NLCi - CS 1% (m/m) e NLCi - CS 1% (m/m) + PF 127 20% (m/m) na gama de concentrações de 0 - 1000 µg/mL.



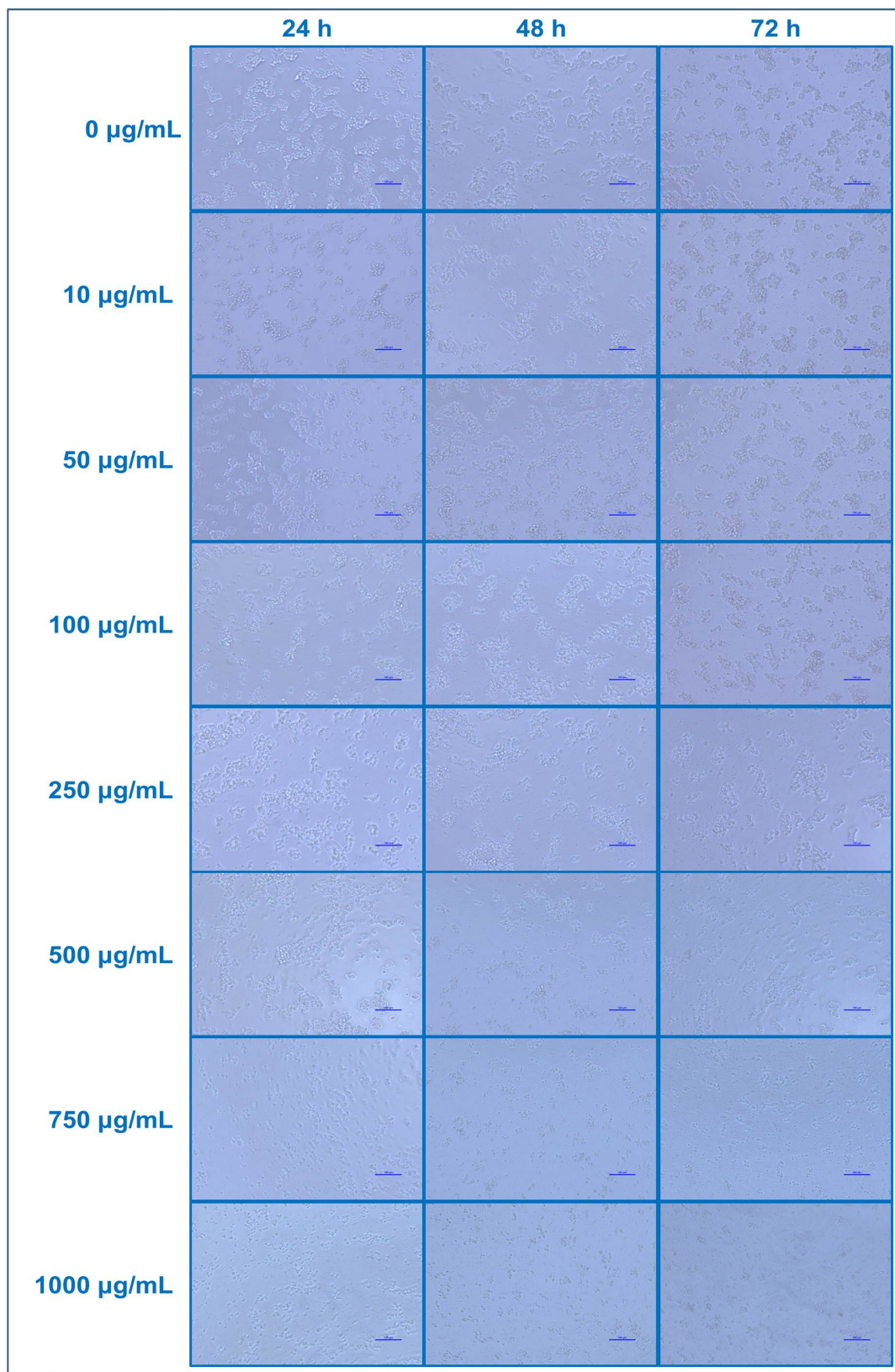
**Figura 76.** Ilustração do resultado final do ensaio de redução do Alamar Blue em células Y-79, 72 horas após a exposição às formulações NLCi, NLCi - CS 1% (m/m) e NLCi - CS 1% (m/m) + PF 127 20% (m/m) na gama de concentrações de 0 - 1000 µg/mL. A coloração azul observada nas concentrações mais elevadas demonstra uma reduzida redução do Alamar Blue, comparativamente à coloração arroxeadada observada nas células controlo (0 µg/mL).

As Figuras 77, 78 e 79 ilustram diferentes imagens de microscopia ótica das células Y-79 expostas às diferentes formulações, durante 24, 48 e 72 h, numa gama de concentrações de 0 - 1000 µg/mL.





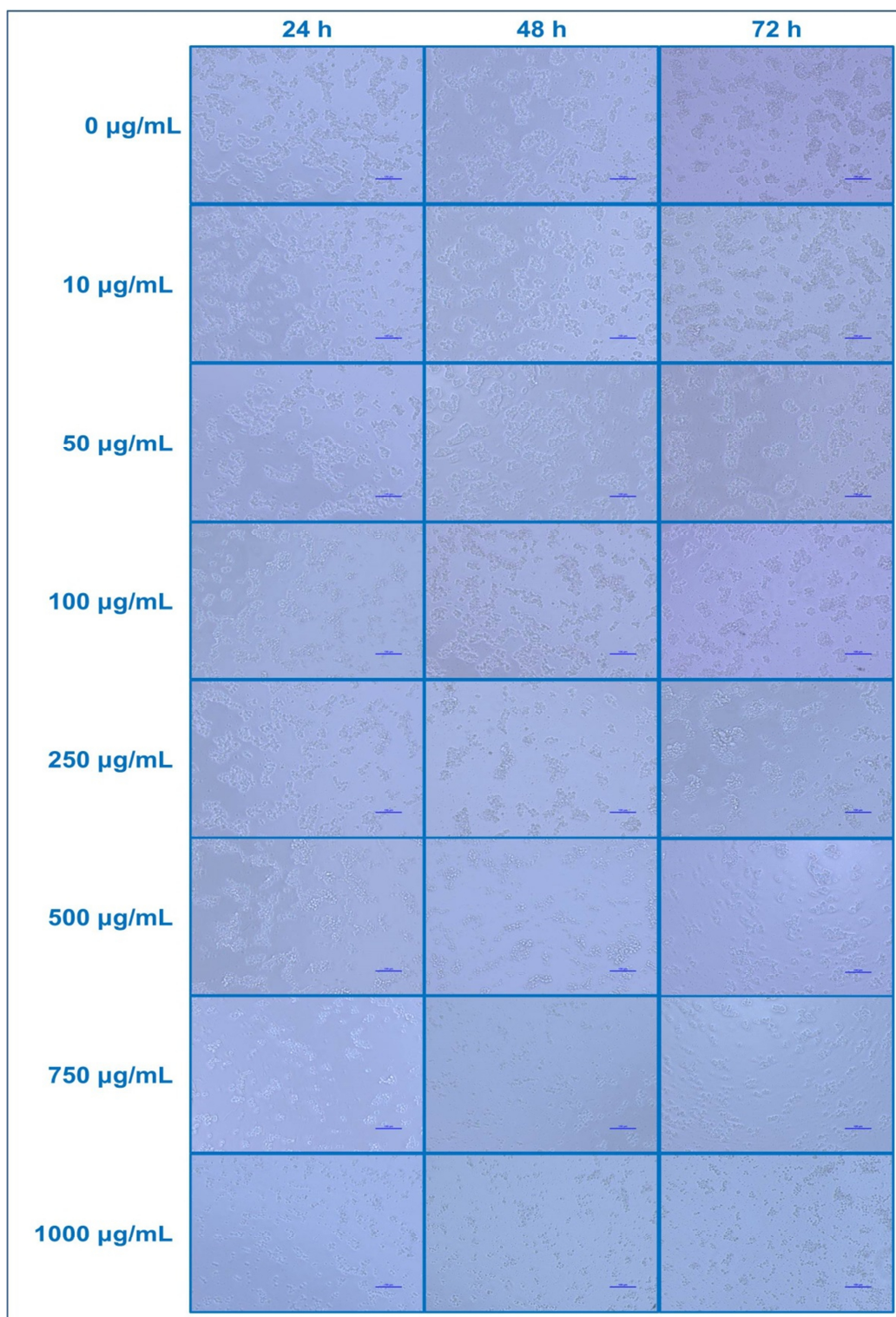
**Figura 77.** Imagens representativas de microscopia ótica das células Y-79 expostas à formulação NLC<sub>i</sub> (0 - 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 24, 48 e 72 h. Ampliação da objetiva: 10 X. Escala indicada nas imagens - 100  $\mu\text{m}$ . Imagens recolhidas com o microscópio Nikon TS 100F equipado com uma câmara digital DS-Fi1.



**Figura 78.** Imagens representativas de microscopia ótica das células Y-79 expostas à formulação NLC<sub>i</sub>-CS 1 %(m/m) (0 - 1000 µg/mL) durante 24, 48 e 72 h.

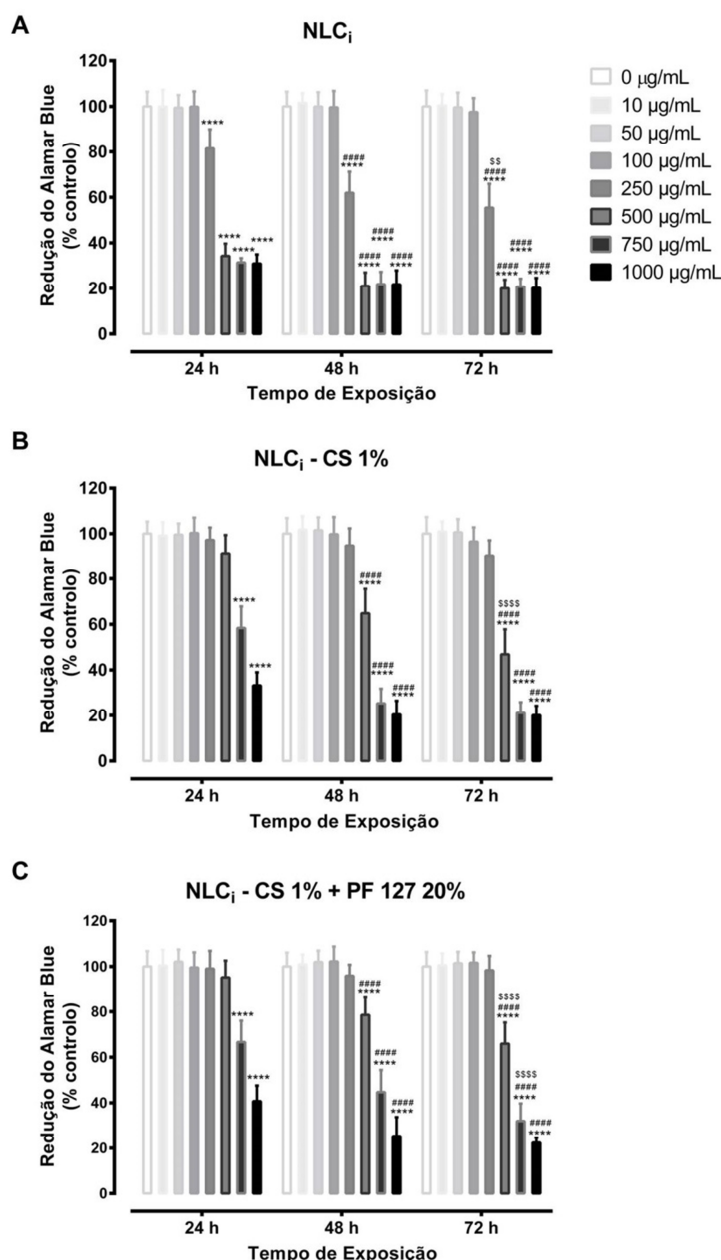
Ampliação da objetiva: 10 X. Escala indicada nas imagens - 100 µm. Imagens recolhidas com o microscópio Nikon TS 100F equipado com uma câmara digital DS-Fi1.





**Figura 79.** Imagens representativas de microscopia ótica das células Y-79 expostas à formulação NLC<sub>i</sub>-CS 1 %(m/m) + PF 127 20% (m/m) (0 - 1000 µg/mL) durante 24, 48 e 72 h. Ampliação da objetiva: 10 X. Escala indicada nas imagens - 100 µm. Imagens recolhidas com o microscópio Nikon TS 100F equipado com uma câmara digital DS-Fi1.

A Figura 80 apresenta os efeitos de citotoxicidade das formulações NLC<sub>i</sub>, NLC<sub>i</sub>+CS 1% (m/m) e NLC<sub>i</sub>+CS 1% (m/m) + PF 127 20% (m/m) numa gama de concentrações de 0-1000 µg/mL, nas células Y-79, durante um tempo de incubação de 72 h. A exposição das células Y-79 às formulações desenvolvidas resultou num efeito citotóxico dependente da concentração da formulação e dependente do tempo de exposição. De facto, a formulação NLC<sub>i</sub>, apresentou um efeito citotóxico significativo após 24 horas de tempo de exposição para concentrações superiores a 250 µg/mL, enquanto as formulações NLC<sub>i</sub>+CS 1% (m/m) e NLC<sub>i</sub>+CS 1% (m/m) + PF 127 20% (m/m) apresentaram um efeito citotóxico significativo após 24 horas de tempo de exposição para concentrações superiores a 750 µg/mL. Este fenómeno deve-se ao facto da formulação NLC<sub>i</sub> apresentar uma concentração de ibuprofeno de 0,2 % (m/m), enquanto as formulações NLC<sub>i</sub>+CS 1% (m/m) e NLC<sub>i</sub>+CS 1% (m/m) + PF 127 20% (m/m) apresentam uma concentração de ibuprofeno de 0,1 % (m/m). Salienta-se que a formulação NLC<sub>i</sub> serviu de base para a preparação das formulações finais NLC<sub>i</sub>+CS 1% (m/m) e NLC<sub>i</sub>+CS 1% (m/m) + PF 127 20% (m/m). Contudo, os resultados deste estudo estão em concordância com os resultados dos estudos anteriores, sugerindo que as formulações oftálmicas desenvolvidas neste estudo podem ser utilizadas com toda a segurança na administração ocular de fármacos, sem ter sido observado nenhum efeito citotóxico significativo, após 72 h de incubação, até uma concentração de 100 µg/mL para a formulação NLC<sub>i</sub> e até uma concentração de 250 µg/mL para as formulações NLC<sub>i</sub>+CS 1% (m/m) e NLC<sub>i</sub>+CS 1% (m/m) + PF 127 20% (m/m) [347,401].



**Figura 80.** Efeito das diferentes dispersões coloidais preparadas na viabilidade celular. **(A)** NLC<sub>i</sub> - NLC encapsulando o ibuprofeno; **(B)** NLC<sub>i</sub> - CS 1% - NLC encapsulando o ibuprofeno disperso num hidrogel de CS 1% (m/m); **(C)** NLC<sub>i</sub> - CS 1% + PF 127 20% - NLC encapsulando o ibuprofeno disperso num hidrogel de CS 1% (m/m) com PF 127 20 % (m/m). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  DP, de 6 experiências independentes (cada experiência foi realizada pelo menos em triplicado), e expressos como percentagem de redução do reagente Alamar Blue relativamente às células controlo [redução do Alamar Azul (% de controlo)]. As comparações estatísticas entre grupos foram efetuadas utilizando o Two-way Anova, seguido do *Tukey's multiple comparisons post hoc test* [\*\*\*\*p <0,0001 concentração vs. controlo (0 µg / mL), a cada tempo de incubação; #####p <0,0001 48 ou 72 horas vs. 24 horas, para cada

concentração;  $^{**}p < 0,01$ ,  $^{****}p < 0,0001$  vs. 72 horas vs. 48 horas, para cada concentração].

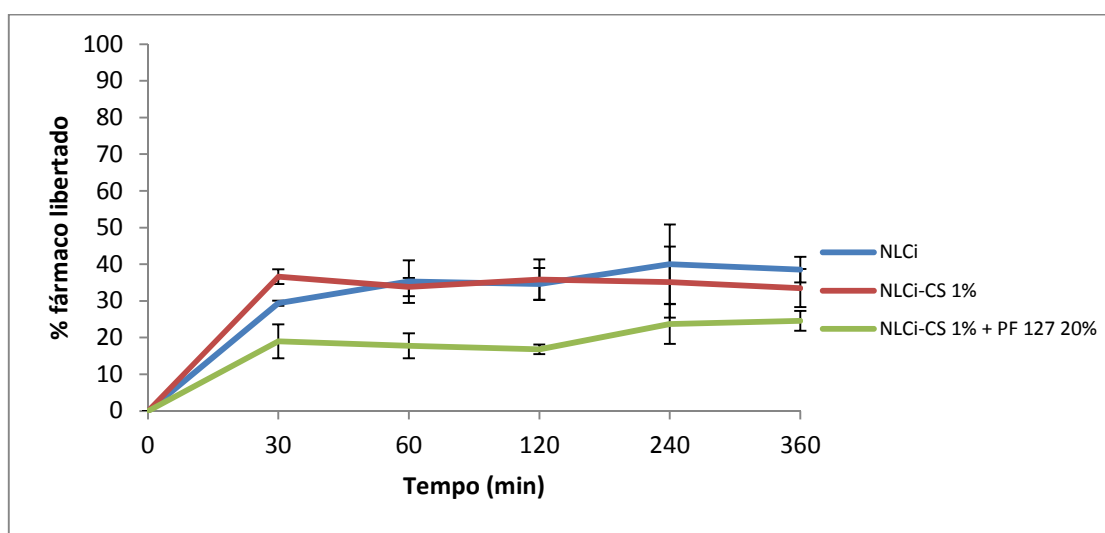
#### 6.3.2.13 Ensaios de libertação/dissolução *in vitro*

##### 6.3.2.13.1 Validação do método de doseamento do ibuprofeno

A validação do método de doseamento do ibuprofeno pode ser consultada no subcapítulo 6.3.2.8.1 para a formulação NLC<sub>i</sub> com 0,2% (m/m) de ibuprofeno) e no subcapítulo 4.3.2.7.1 para as formulações NLC<sub>i</sub>-CS 1% e NLC<sub>i</sub>-CS 1% + PF 127 20%.

##### 6.3.2.13.2 Resultados do ensaio de libertação/dissolução *in vitro*

Os perfis de libertação *in vitro* do ibuprofeno a partir das formulações NLC<sub>i</sub>, NLC<sub>i</sub>-CS 1% e NLC<sub>i</sub>-CS+PF127 20% em solução tampão fosfato pH 7,4 são apresentados na Figura 81.



**Figura 81.** Perfil de libertação *in vitro* do ibuprofeno a partir das formulações NLC<sub>i</sub>, NLC<sub>i</sub>-CS 1% (m/m) e NLC<sub>i</sub>-CS 1% (m/m) + PF 127 20% (m/m).

Os perfis de libertação *in vitro* do ibuprofeno a partir das diferentes dispersões coloidais demonstraram haver um prolongamento da libertação do fármaco encapsulado durante várias horas. Ao fim de 6 horas de ensaio, somente 39% de ibuprofeno foi

libertado a partir da dispersão NLC<sub>i</sub>. A adição do hidrogel de quitosano à dispersão NLC<sub>i</sub> não causou mudanças significativas no perfil de libertação do ibuprofeno, libertando aproximadamente 34% de ibuprofeno ao fim das 6 horas de ensaio.

Como seria de esperar, a adição do polímero termossensível PF 127 20 % (m/m) à dispersão NLC<sub>i</sub>-CS 1% promoveu um aumento do prolongamento da libertação do ibuprofeno. Assim, ao fim das 6 horas de estudo, somente cerca de 25% do ibuprofeno foi libertado a partir da formulação NLC<sub>i</sub>-CS 1% + PF 127 20%.

Através do cálculo do factor de semelhança conclui-se que o perfil de dissolução do NLC<sub>i</sub> é semelhante ao perfil de dissolução do NLC<sub>i</sub>-CS 1% ( $f_2=66,5$ ) e é diferente do perfil de dissolução do NLC<sub>i</sub>-CS 1% + PF 127 20% ( $f_2=40,5$ ). Da mesma forma, conclui-se que o perfil de dissolução do NLC<sub>i</sub>-CS 1% é diferente do perfil de dissolução do NLC<sub>i</sub>-CS 1% + PF 127 20% ( $f_2=41,0$ ).

#### 6.4 Conclusões

Os NLC preparados neste estudo apresentaram um tamanho médio (Z-ave) de 120 nm, um índice de polidispersão (PI) inferior a 0,22, um potencial zeta (ZP) superior a +35 mV e uma eficácia de encapsulação de cerca de 82%. A adição de quitosano e de PF 127 à dispersão coloidal não produziu alterações significativas nas propriedades físico-químicas dos NLC. Os estudos de mucoadesão demonstraram que o quitosano presente nas formulações oftálmicas desenvolvidas estabelece interações eletrostáticas com a mucina, uma glicoproteína presente na superfície do globo ocular. Os ensaios de biocompatibilidade realizados com a linha celular do retinoblastoma humano Y-79 baseado na redução do reagente Alamar Blue demonstraram que as formulações desenvolvidas não apresentaram efeitos significativos na viabilidade celular após 72 h de incubação até uma concentração de 100 µg/mL para a formulação NLC<sub>i</sub> e até uma concentração de 250 µg/mL para as formulações NLC<sub>i</sub>+CS 1% (m/m) e NLC<sub>i</sub>+CS 1% (m/m) + PF 127 20% (m/m). Os ensaios de libertação *in vitro* demonstraram que a encapsulação do ibuprofeno num transportador coloidal como os NLC promoveu uma libertação sustentada durante várias horas. A adição de quitosano à dispersão coloidal não provocou alterações na libertação do fármaco, enquanto a adição do PF 127 à formulação anterior (NLC<sub>i</sub>-CS), promoveu o prolongamento da libertação do ibuprofeno ao longo do tempo.

Em suma, a adição de um polímero com propriedades mucoadesivas, como o quitosano, ou a adição de um polímero sensível à temperatura, como o PF 127, à

dispersão coloidal desenvolvida nesta etapa do trabalho promoveu um aumento da biodisponibilidade da formulação oftálmica. Estes polímeros, em condições fisiológicas, promovem a gelificação e o aumento da mucoadesividade da dispersão coloidal na superfície ocular, aumentando o tempo de residência pré-corneal. As propriedades físico-químicas das dispersões coloidais desenvolvidas neste trabalho demonstraram que estas formulações poderiam ser utilizadas para a administração oftálmica de fármacos como o ibuprofeno, sem causar qualquer tipo de desconforto, irritação ou visão turva. Além disso, as formulações desenvolvidas demonstraram ser inócuas, podendo ser utilizadas com toda a segurança, permitindo a liberação prolongada do fármaco encapsulado.



## 7. Conclusões finais e perspectivas futuras

Os polímeros sensíveis a estímulos apresentam-se como excipientes farmacêuticos que podem ter uma importância fulcral no desenvolvimento de novos sistemas capazes de veicular os fármacos para um determinado alvo terapêutico. Na realidade estes polímeros promovem a libertação modificada dos fármacos, diminuindo assim os efeitos secundários.

Com este trabalho, foi possível verificar que a utilização de polímeros termossensíveis, como os poloxâmeros (LF 127 e LF 108), em hidrogéis de aplicação cutânea, promoveu o aumento dos parâmetros de textura (firmeza e adesividade), da viscosidade e do tempo de retenção do fármaco, permitindo a sua libertação prolongada. Comprovou-se também que o tipo de fármaco incorporado, a temperatura, o tempo de armazenamento, o tipo e a concentração de polímero termossensível utilizado, influenciam as características dos hidrogéis, nomeadamente o pH, a textura, a viscosidade e a libertação *in vitro* do fármaco veiculado. Estes resultados permitiram concluir que a utilização destes hidrogéis em formas farmacêuticas semissólidas de aplicação cutânea poderá constituir uma excelente alternativa à administração oral de determinados fármacos (por exemplo anti-inflamatórios), minimizando os seus potenciais efeitos secundários.

A administração oftálmica tópica apresenta-se como uma via de administração de eleição por parte dos pacientes, uma vez que não é invasiva, é indolor e a sua administração pode ser efetuada pelo próprio. No entanto, as formulações oftálmicas convencionais de aplicação tópica apresentam uma reduzida eficácia terapêutica, uma vez que, são facilmente eliminadas pelos mecanismos de defesa do globo ocular. A condicionar a baixa eficácia terapêutica deste tipo de formulações está o tempo reduzido que a formulação permanece na superfície ocular. Neste trabalho recorreu-se à preparação de dispersões coloidais de NLC para aumentar as propriedades mucoadesivas, o tempo de residência e a capacidade de penetração dos fármacos através dos tecidos oculares. Vários ensaios *in vivo* e de permeação *ex vivo* publicados anteriormente já tinham comprovado que a utilização de NLC em formulações oftálmicas de aplicação tópica promovia o aumento da biodisponibilidade e da eficácia terapêutica dos fármacos oculares. No entanto, atendendo ao facto de as dispersões coloidais apresentarem uma baixa viscosidade, grande parte destas formulações para uso oftálmico, são facilmente eliminadas após a sua administração pelos mecanismos de defesa do globo ocular. A simples adição de agentes viscosificantes às dispersões coloidais traria mais desvantagens do que vantagens, uma vez que, estes, aumentariam

de forma exponencial a viscosidade das formulações, o que impossibilitaria a administração tópica de quantidades precisas e reproduzíveis. Assim, neste trabalho procedeu-se à adição de polímeros sensíveis a estímulos, fazendo com que a formulação oftálmica desenvolvida, somente na presença das propriedades físico-químicas específicas dos tecidos oculares, sofresse uma transição de fase sol-gel, aumentando a sua viscosidade. Este tipo de formulações permite uma administração tópica fácil e reproduzível, uma vez que se apresentam na forma líquida e com baixa viscosidade, sofrendo somente uma transição de fase sol-gel na presença de condições físico-químicas muito específicas existentes na superfície do globo ocular.

Os diferentes NLC preparados apresentaram tamanhos inferiores a 200 nm, com índices de polidispersão inferiores a 0,3, potenciais zeta positivos, elevadas eficácias de encapsulação do fármaco veiculado e demonstraram ser estáveis, tanto em contacto com o fluido lacrimal artificial, como durante o tempo de armazenamento. Pode concluir-se assim, que as nanopartículas lipídicas desenvolvidas são susceptíveis de serem administradas topicamente nos tecidos oculares sem que ocorra qualquer tipo de desconforto ou irritação. A bibliografia consultada refere que estes fenómenos são passíveis de ocorrer no caso de nanopartículas com tamanhos superiores a 400 nm. Salienta-se também que as nanopartículas preparadas apresentaram carga elétrica de superfície positiva, o que permite a interação eletrostática com as cargas negativas características dos tecidos oculares, permitindo dessa forma o aumento do tempo de residência deste tipo de formulações na mucosa ocular. A adição de um polímero termossensível, como o PF 127, às dispersões coloidais de NLC desenvolvidas, permitiu que através da simulação das condições fisiológicas (de temperatura e de diluição no fluido lacrimal artificial), as formulações sofressem uma transição de fase sol-gel a temperaturas inferiores 35°C (temperatura da superfície ocular). Demonstrou-se assim que, em condições fisiológicas, se verifica um aumento da viscosidade da formulação, aumentando assim o tempo de residência na superfície ocular. Estas formulações promoveram uma libertação prolongada do fármaco veiculado, em contraste com o simples hidrogel de PF 127. Os ensaios de biocompatibilidade executados com a linha celular do retinoblastoma humano Y-79 e os ensaios *in vitro* de irritabilidade ocular por HET-CAM demonstraram que as formulações desenvolvidas são inócuas para os tecidos oculares.

A associação de polímeros inteligentes que respondem a diferentes estímulos no mesmo sistema farmacêutico apresenta-se como uma alternativa viável com o intuito de melhorar a vetorização do fármaco veiculado para um determinado alvo terapêutico, aumentando assim a eficácia terapêutica e diminuindo drasticamente os efeitos

secundários. Assim, a criação de um sistema polimérico constituído por polímeros que respondem a diferentes estímulos tirando partido das diferentes características físico-químicas específicas do alvo terapêutico, promove a libertação direcionada do(s) fármaco(s) veiculados no alvo terapêutico. Estudos científicos publicados relatam que a preparação de simples hidrogéis oftálmicos baseados na associação de polímeros que respondem a estímulos distintos apresenta melhores resultados do que hidrogéis oftálmicos preparados unicamente por um polímero sensível a um único estímulo [15,177,213,253,254]. Baseado nestes estudos, combinaram-se numa mesma forma farmacêutica dois polímeros sensíveis a estímulos distintos a um transportador coloidal (NLC), com vista a aumentar a vetorização, a biodisponibilidade e a eficácia terapêutica do sistema farmacêutico. Assim, a adição em simultâneo de um polímero termossensível, como o PF 127, e um polímero sensível ao pH com características mucoadesivas, como o quitosano, à dispersão coloidal de NLC teve por objetivo aproveitar as diferentes propriedades físico-químicas da superfície do tecido ocular, fazendo com que ocorresse a transição de fase sol-gel a uma temperatura inferior a 35°C, aumentando também as propriedades mucoadesivas da formulação final. A formulação final apresentou assim as vantagens associadas às nanopartículas lipídicas (NLC), aliada às vantagens associadas à utilização de polímeros sensíveis a estímulos. Os NLC preparados nesta etapa do trabalho experimental apresentaram tamanhos inferiores a 150 nm, índices de polidispersão inferiores a 0,3, potenciais zeta positivos e elevada eficácia de encapsulação do fármaco veiculado. Salienta-se o facto das formulações finais terem sido estáveis, tanto em contacto com o fluido lacrimal artificial, como em contacto com as glicoproteínas presentes nos tecidos oculares, a mucina e a lisozima. Os ensaios de biocompatibilidade executados com a linha celular do retinoblastoma humano Y-79 demonstraram que as formulações testadas são inócuas após 72 h de incubação até uma concentração de 100 µg/mL para a formulação NLC<sub>i</sub> e até uma concentração de 250 µg/mL para as formulações NLC<sub>i</sub>+CS 1% (m/m) e NLC<sub>i</sub>+CS 1% (m/m) + PF 127 20% (m/m). As diferentes formulações desenvolveram uma libertação prolongada do fármaco ao longo do tempo. Apesar dos bons resultados obtidos, o desempenho de todas as formulações desenvolvidas terá que ser avaliado e comprovado com ensaios *ex vivo* e *in vivo*.

Com base nos resultados dos trabalhos experimentais descritos nesta dissertação, está aberta uma janela de oportunidade para as formas farmacêuticas oftálmicas de aplicação tópica baseada na combinação de duas estratégias: os polímeros sensíveis a estímulos e as nanopartículas lipídicas. Como foi possível demonstrar simulando as condições fisiológicas, este tipo de estratégia proporciona o aumento da

viscosidade da formulação quando em contacto com a superfície ocular, aumentando dessa forma o tempo de residência das formulações na mucosa ocular, proporcionando o aumento da eficácia terapêutica, sendo necessário menos administrações diárias, permitindo a diminuição dos efeitos secundários e uma maior adesão à terapêutica.

De notar que hoje em dia existe uma pesquisa incessante com vista a descobrir novos polímeros, co-polímeros e novos lípidos com propriedades inovadoras que possam aumentar a biodisponibilidade e a eficácia terapêutica das formas farmacêuticas. A utilização dessas novas substâncias em sistemas farmacêuticos como os que foram desenvolvidos nesta tese pode exponenciar a eficácia terapêutica das formulações oftálmicas.

Apesar de existirem variadíssimas patentes registadas que relatam a utilização de polímeros mucoadesivos, polímeros sensíveis a estímulos e transportadores coloidais em formulações oftálmicas para aplicação tópica, são escassas as formulações existentes com este tipo de estratégias disponíveis no mercado. De facto, no mercado, até este momento, existem algumas formas farmacêuticas baseadas em transportadores coloidais, nomeadamente, microemulsões (Lipimix<sup>®</sup>), nanoemulsões (Refresh<sup>®</sup>, Trusopt<sup>®</sup>, SootheXP<sup>®</sup>), nanoemulsões catiónicas (Cationorm<sup>®</sup>, Durezol<sup>®</sup>), nanoemulsões aniónicas (Restasis<sup>®</sup>) e lipossomas (Tear Again<sup>®</sup> Advanced). Salienta-se que não existem no mercado formulações oftálmicas preparadas com nanopartículas. Uma explicação para isto poderá ser o facto de se desconhecer os efeitos toxicológicos do uso prolongado de formas farmacêuticas baseadas em nanopartículas nos tecidos oculares. É assim necessário proceder à realização de mais ensaios clínicos que comprovem a inocuidade deste tipo de sistema farmacêutico aplicado no sistema ocular.

O futuro das formas farmacêuticas oftálmicas de aplicação tópica passa pelo aumento do tempo de residência da formulação na região pré-corneal e, pelo aumento da capacidade de penetração da formulação através dos tecidos oculares com vista a atingir o alvo terapêutico. A adição de polímeros sensíveis a estímulos a nanotransportadores coloidais traduz-se num aumento do tempo de residência pré-corneal associada à utilização dos polímeros e, num aumento da capacidade mucoadesiva e de penetração associada à utilização dos nanotransportadores coloidais. O aumento da biodisponibilidade e da eficácia terapêutica associada à redução dos efeitos secundários e à diminuição do número de administrações diárias, fará, desta estratégia, um caminho a seguir pela indústria farmacêutica.

## Referências Bibliográficas

- [1]. Almeida, HEPPJ. Polímeros inteligentes: classificação e aplicação em sistemas de libertação modificada de fármacos [Seminário de Doutoramento em Ciências Farmacêuticas]. Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; 2012.
- [2]. Amaral, MHAR. Modulação da cedência de fármacos. Efeito das características tecnológicas nos modelos de libertação. [Tese de Doutoramento em Ciências Farmacêuticas]. Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; 2003.
- [3]. Farmacopeia Portuguesa, 9.0 ed. Lisboa: Infarmed - Ministério da Saúde; 2009.
- [4]. Liberal, JPM. Desenvolvimento e caracterização de comprimidos matriciais de dupla camada contendo Paracetamol [Dissertação]. Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; 2008.
- [5]. Almeida, HEPPJ. Preparação e caracterização de dispersões sólidas e micropartículas lipídicas contendo ibuprofeno [Dissertação]. Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; 2009.
- [6]. Oswald W. Terapêutica Medicamentosa e suas Bases Farmacológicas, Manual de Farmacologia e Farmacoterapia. 4ª ed. Porto: Porto Editora; 2001.
- [7]. Coelho JF, Ferreira PC, Alves P, Cordeiro R, Fonseca AC, Góis JR. Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments. EPMA J 2010 Mar; 1(1): 164-209.
- [8]. Bajpai AK, Shukla SK, Bhanu S, Kankane S. Responsive polymers in controlled drug delivery. Prog Polym Sci 2008 Nov; 33 (11): 1088-1118.
- [9]. Lachman L. Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica. 1ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 2001.
- [10]. Prista LN, Alves AC, Morgado R. Tecnologia Farmacêutica. 4ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 1996.
- [11]. Ludwig A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. Adv Drug Deliv Rev 2005 Nov; 57 (11): 1595-1639.
- [12]. Pijls RT, Sonderkamp T, Daube GW, Krebber R, Hanssen HH, Nuijts RM, et al. Studies on a new device for drug delivery to the eye. Eur J Pharm Biopharm 2005 Feb; 59 (2): 283-288.
- [13]. Pignatello R, Puglisi G. Nanotechnology in Ophthalmic Drug Delivery Systems: A Survey of Recent Developments and Patenting Activity. Recent Pat Nanomed 2011 Jan; 1 (1): 42-54.

- [14]. Almeida H, Amaral MH, Lobão P, Silva AC, Sousa Lobo JM. Applications of lipid and polymeric nanoparticles in ophthalmic pharmaceutical formulations: present and futures considerations. *J Pharm Pharm Sci* 2014 Jul; 17 (3): 278-293.
- [15]. Almeida H, Amaral MH, Lobão P, Sousa Lobo JM. *In situ* gelling systems: a strategy to improve the bioavailability of ophthalmic pharmaceutical formulations. *Drug Discov Today* 2014 Apr; 19 (4): 400-412.
- [16]. Morrison PW, Khutoryanskiy VV. Advances in ophthalmic drug delivery. *Ther Deliv* 2014 Dec; 5 (12): 1297-1315.
- [17]. Gaudana R, Jwala J, Baddu SH, Mitra AK. Recent perspectives in ocular drug delivery. *Pharm Res* 2009 May; 26 (5): 1197-1216.
- [18]. Wu Y, You J, Zhou J, Dahmani FZ. Enhanced and sustained topical ocular delivery of cyclosporine A in thermosensitive hyaluronic acid based *in situ* forming microgels. *Int J Nanomedicine* 2013 Sep; 8: 3587-3601.
- [19]. Almeida H, Amaral MH, Lobão P, Sousa Lobo JM. Applications of Poloxamers in Ophthalmic Pharmaceutical Formulations: An Overview. *Expert Opin Drug Deliv* 2013 Sep; 10 (9): 1223-1237.
- [20]. Boddu SH, Gupta H, Patel S. Drug Delivery to the Back of the Eye Following Topical Administration: An Update on Research and Patenting Activity. *Recent Pat Drug Deliv Formul* 2014 Apr; 8 (1): 27-36.
- [21]. Khare A, Grover K, Pawar P, Singh I. Mucoadhesive Polymers for Enhancing Retention in Ocular Drug Delivery: A critical Review. *Rev Adhesion Adhesives* 2014 Nov; 2 (4): 467-502.
- [22]. Hathout RM, Omran MK. Gelatin-based particulate systems in ocular drug delivery. *Pharm Dev Technol* 2015; In press.
- [23]. Sasaki H, Yamamura K, Nishida K, Nakamura J, Ichikawa M. Delivery of drugs to the eye by topical application. *Prog Ret Eye Res* 1996 Jan; 15 (2): 583-620.
- [24]. Diebold Y, Jarrin M, Saez V, Carvalho EL, Orea M, Calonge M, et al. Ocular drug delivery by liposome-chitosan nanoparticle complexes (LCS-NP). *Biomaterials* 2007 Mar; 28 (8): 1553-1564.
- [25]. Motwani SK, Chopra S, Talegaonkar S, Kohli K, Ahmad FJ, Khar RK. Chitosan-sodium alginate nanoparticles as submicroscopic reservoirs for ocular delivery: formulation, optimisation and *in vitro* characterisation. *Eur J Pharm Biopharm* 2008 Mar; 68 (3): 513-525.
- [26]. Araújo J, Gonzalez E, Egea MA, Garcia ML, Souto EB. Nanomedicines for ocular NSAIDs: safety on drug delivery. *Nanomedicine* 2009 Dec; 5 (4): 394-401.

- [27]. Araújo J, Veja E, Lopes C, Egea MA, Garcia ML, Souto EB. Effect of polymer viscosity on physicochemical properties and ocular tolerance of FB-loaded PLGA nanospheres. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2009 Aug; 72 (1): 48-56.
- [28]. Seyfoddin A, Shaw J, Al-Kassas R. Solid lipid nanoparticles for ocular drug delivery. *Drug Deliv* 2010 Sep-Out; 17 (7): 467-489.
- [29]. Nirmal HB, Bakliwal SR, Pawar SP. *In-Situ* gel: New trends in Controlled and Sustained Drug Delivery System. *Int J PharmTech Res* 2010 Apr; 2 (2): 1398-1408.
- [30]. Agarwal KI, Mehta N, Namdev A, Gupta AK. *In-situ* gel formation for ocular drug delivery system an overview. *Asia J Bio Pharm Sci* 2011 Dec; 1 (4): 1-7.
- [31]. Champalal KD, Sushilkumar P. Current status of ophthalmic *in-situ* forming hydrogel. *Int J Pharm Bio Sci* 2012 Jul; 3 (3): 372-388.
- [32]. Achouri D, Alhanout K, Piccerelle P, Andrieu V. Recent advances in ocular drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm* 2013 Nov; 39 (11): 1599-1617.
- [33]. Li J, Wu L, Wu W, Wang B, Wang Z, Xin H, et al. A potential carrier based on liquid crystal nanoparticles for ophthalmic delivery of pilocarpine nitrate. *Int J Pharm* 2013 Oct; 455 (1-2): 75-84.
- [34]. Li X, Zhang Z, Chen H. Development and evaluation of fast forming nano-composite hydrogel for ocular delivery of diclofenac. *Int J Pharm* 2013 May, 448 (1): 96-100.
- [35]. Ako-Adounvo AM, Nagarwal RC, Oliveira L, Boddu SHS, Wang XS, Dey S, et al. Recent Patents on Ophthalmic Nanoformulations and Therapeutic Implications. *Recent Pat Drug Deliv Formul* 2014 Sep; 8 (3): 193-201.
- [36]. Horvát G, Gyarmati B, Berkó S, Szabó-Révész P, Szilágyi BA, Szilágyi A, et al. Thiolated poly(aspartic acid) as potential *in situ* gelling, ocular mucoadhesive drug delivery system. *Eur J Pharm Sci* 2015 Jan; 67 (1): 1-11.
- [37]. Meisner D, Mezei M. Liposome ocular delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 1995 Aug; 16 (1): 75-93.
- [38]. Mohanambal E, Arun k, Abdul Hasan Sathali A. Formulation and Evaluation of pH-triggered *in situ* Gelling System of Levofloxacin. *Indian J Pharm Educ Res* 2011; 45 (1): 58-64.
- [39]. Zimmer A, Kreuter J. Microspheres and nanoparticles used in ocular delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 1995 Aug; 16 (1): 61-73.
- [40]. Zignani M, Tabatabay C, Gurny R. Topical semi-solid drug delivery: kinetics and tolerance of ophthalmic hydrogels. *Adv Drug Deliv Rev* 1995 Aug; 16 (1): 51-60.
- [41]. Järvinen K, Järvinen T, Urtti A. Ocular absorption following topical delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 1995 Aug; 16 (1): 3-19.

- [42]. Urtti A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2006 Nov; 58 (11): 1131-1135.
- [43]. Li N, Zhuang C, Wang M, Sun X, Nie S, Pan W. Liposome coated with low molecular weight chitosan and its potential use in ocular drug delivery. *Int J Pharm* 2009 Sep; 379 (1): 131-138.
- [44]. Bhattarai N, Gunn J, Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2010 Jan; 62 (1): 83-99.
- [45]. Diebold Y, Calonge M. Applications of nanoparticles in ophthalmology. *Prog Retin Eye Res* 2010 Nov; 29 (6): 596-609.
- [46]. Gan L, Wang J, Jiang M, Bartlett H, Ouyang D, Eperjesi F, et al. Recent advances in topical ophthalmic drug delivery with lipid-based nanocarriers. *Drug Discov Today* 2013 Mar; 18 (5-6): 290-297.
- [47]. Leonardi A, Bucolo C, Drago F, Salomone S, Pignatello R. Cationic solid lipid nanoparticles enhance ocular hypotensive effect of melatonin in rabbit. *Int J Pharm* 2015 Jan; 478 (1): 180-186.
- [48]. Balasubramaniam J, Kant S, Pandit JK. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the Gelrite gellan gum-based ocular delivery system for indomethacin. *Acta Pharm* 2003 Dec; 53 (4): 251-261.
- [49]. Pignatello R, Bucolo C, Ferrara P, Maltese A, Puleo A, Pugglisi G. Eudragit RS100® nanosuspensions for the ophthalmic controlled delivery of ibuprofen. *Eur J Pharm Sci* 2002 Jul; 16 (1-2): 53-61.
- [50]. Pignatello R, Bucolo C, Spedalieri G, Maltese A, Pugglisi G. Flurbiprofen-loaded acrylate polymer nanosuspensions for ophthalmic application. *Biomaterials* 2002 Aug; 23 (15): 3247-3255.
- [51]. Bonferoni MC, Sandri G, Gavini E, Rossi S, Ferrari F, Caramella C. Microparticle systems based on polymer drug interaction for ocular delivery of ciprofloxacin I. *In vitro* characterization. *J Drug Del Sci Tech* 2007 Dec; 17 (1): 57-62.
- [52]. Shen J, Deng Y, Jin X, Ping Q, Su Z, Li L. Thiolated nanostructured lipid carriers as a potential ocular delivery system for cyclosporine A: Improving *in vivo* ocular distribution. *Int J Pharm* 2010 Dec; 402 (1-2): 248-253.
- [53]. Gan L, Han S, Shen J, Zhu J, Zhu C, Zhang X, et al. Self-assembled liquid crystalline nanoparticles as a novel ophthalmic delivery system for dexamethasone: Improving preocular retention and ocular bioavailability. *Int J Pharm* 2010 Aug; 396 (1-2): 179-187.
- [54]. Müller RH, Shegokar R, Keck CM. 20 years of lipid nanoparticles (SLN and NLC): present state of development and industrial applications. *Curr Drug Discov Technol* 2011 Sep; 8 (3): 207-227.



- [55]. Moya-Ortega MD, Alves TFG, Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A, Stefánsson E, Thorsteinsdóttir M, et al. Dexamethasone eye drops containing  $\gamma$ -cyclodextrin-based nanogels. *Int J Pharm* 2013 Jan; 41 (1-2): 507–551.
- [56]. Ribeiro A, Sandez-Macho I, Casas M, Alvarez-Pérez S, Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A. Poloxamine micellar solubilization of  $\alpha$ -tocopherol for topical ocular treatment. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2013 Mar; 103: 550-557.
- [57]. Agrawal V, Kumar M, Pathak K. Defining the Properties of pH-sensitive Polymeric Micellar Ocular Delivery System of Miconazole Nitrate for the Management of Fungal Endophthalmitis. *Pharm Nanotechnol* 2014 Sep; 2 (3): 157-166.
- [58]. Pignatello R, Leonardi A, Cupri S. Optimization and Validation of a New Method for the Production of Lipid Nanoparticles for Ophthalmic Application. *Int J Med Nano Res* 2014 Jan; 1 (1): 1-6.
- [59]. Fangueiro JF, Silva AM, Garcia ML, Souto EB. Current nanotechnology approaches for the treatment and management of the diabetic retinopathy. *Eur J Pharm Biopharm* 2015 Sep; 95 (Pt B): 307-322.
- [60]. Land MF, Fernald RD. The Evolution of Eyes. *Annu Rev Neurosci* 1992 Mar; 15 (1): 1-29.
- [61]. Presland A, Myatt J. Ocular anatomy and physiology relevant to anaesthesia. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* 2010 Oct; 11 (10): 438-443.
- [62]. Malhotra A, Minja FJ, Crum A, Burrowes D. Ocular Anatomy and Cross-Sectional Imaging of the Eye. *Semin Ultrasound CT MRI* 2011 Feb; 32 (1): 2-13.
- [63]. Boursais CL, Acar L, Zia H, Sado PA, Needham T, Leverage R. Ophthalmic drug delivery systems: recent advances. *Prog Retin Eye Res* 1998 Jan; 17 (1): 33-58.
- [64]. Patil BB, Dowd TC. Physiological functions of the eye. *Curr Anaesth Crit Care* 2000 Dec; 11 (6): 293-298.
- [65]. Smerdon D. Anatomy of the eye and orbit. *Curr Anaesth Crit Care* 2000 Dec; 11 (6): 286-292.
- [66]. Troy DB, Beringer P. Remington: The science and Practice of Pharmacy. 21<sup>a</sup> ed. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
- [67]. de la Fuente M, Raviña M, Paolicelli P, Sanchez A, Seijo B, Alonso MJ. Chitosan-based nanostructures: A delivery platform for ocular therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 2010 Jan; 62 (1): 100-117.
- [68]. Rolando M, Zierhut M. The Ocular Surface and Tear Film and Their Dysfunction in Dry Eye Disease. *Surv Ophthalmol* 2001 Mar; 45 (2): S203-S210.
- [69]. Baeyens V, Percicot C, Zignani M, Gurny R, Kaltsatos VV, Deshpande AA. Ocular drug delivery in veterinary medicine. *Adv Drug Deliv Rev* 1997 Dec; 28 (3): 335-361.

- [70]. Baeyens V, Gurny R. Chemical and physical parameters of tears relevant for the design of ocular drug delivery formulations. *Pharm Acta Helv* 1997 Sep; 72 (4): 191-202.
- [71]. El-Kamel AH. *In vitro* an *in vivo* evaluation of Pluronic F127-based ocular delivery system for timolol maleate. *Int J Pharm* 2002 Jul; 241 (1): 47-55.
- [72]. Xinming L, Yingde C, Lloyd AW, Mikhalovsky SV, Sandeman SR, Howel CA, et al. Polymeric hydrogels for novel contact lens-based ophthalmic drug delivery systems: a review. *Cont Lens Anterior Eye* 2008 Apr; 31 (2): 57-64.
- [73]. Suresh PK, Sah AK. Nanocarriers for ocular delivery for possible benefits in the treatment of anterior uveitis: focus on current paradigms and future directions. *Expert Opin Drug Deliv* 2014 Nov; 11 (11): 1-22.
- [74]. Greaves JL, Olejnik O, Wilson CG. Polymers and the precorneal tear film. *STP Pharma Sci* 1992 Jan; 2 (1): 13-33.
- [75]. Romanelli L, Valeri P, Morrone LA, Pimpinella G, Graziani G, Tita B. Ocular absorption and distribution of bendazac after topical administration to rabbits with different vehicles. *Life Sci* 1994 Feb; 54 (13): 877-885.
- [76]. Carvalho IM, Marques CS, Oliveira RS, Coelho PB, Costa PC, Ferreira DC. Sustained drug release by contact lenses for glaucoma treatment-A review. *J Control Release* 2015 Mar; 202: 76-82.
- [77]. Duan Y, Cai X, Du H, Zhai G. Novel *in situ* gel systems based on P123/TPGS mixed micelles and gellan gum for ophthalmic delivery of curcumin. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces* 2015 April; 128: 322-330.
- [78]. Robinson JR. Ocular drug delivery. Mechanism of corneal drug transport and mucoadhesive delivery systems. *STP Pharma* 1989; 5 (1): 839-846.
- [79]. Edsman K, Carlfors J, Petersson R. Rheological evaluation of poloxamer as an *in situ* gel for ophthalmic use. *Eur J Pharm Sci* 1998 Apr; 6 (2): 105-112.
- [80]. Abdel-Mottaleb MMA, Mortada ND, Elshamy AA, Awad GAS. Preparation and evaluation of Fluconazole Gels. *Egypt J Biomed Sci* 2007 Jul; 23 (1): 266-286.
- [81]. Nagarwal RC, Kant S, Singh PN, Maiti P, Pandit JK. Polymeric nanoparticulate system: A potential approach for ocular drug delivery. *J Control Release* 2009 May; 136 (1): 2-13.
- [82]. Robinson JR, Mlynek GM. Bioadhesive and phase-change polymers for ocular drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 1995 Aug; 16 (1): 45-50.
- [83]. Sandri G, Bonferoni MC, Rossi S, Ferrari F, Mori M, Fante CD, et al. Platelet lysate formulations based on mucoadhesive polymers for the treatment of corneal lesions. *J Pharm Pharmacol* 2011 Feb; 63 (2): 189-198.

- [84]. Geethalakshmia A, Karkib R, Sagib P, Jhac SK, Venkatesh DP. Temperature Triggered *In situ* Gelling System for Betaxolol in Glaucoma. J App Pharm Sci 2013 Feb; 3 (2): 153-159.
- [85]. Bawa P, Pillay V, Choonara YE, Toit LC. Stimuli-responsive polymers and their applications in drug delivery. Biomed Mater 2009 Mar; 4 (2): 1-15.
- [86]. Ho DH, Brown NS, Yen A, Holmes R, Keating M, Abuchowski A, et al. Clinical pharmacology of polyethylene glycol-L-asparaginase. Drug Metab Dispos 1986 May-Jun; 14 (3): 349-352.
- [87]. Stella VJ, Nti-Addae KW. Prodrug strategies to overcome poor water solubility. Adv Drug Deliver Rev 2007 Jul; 59 (7): 677-694.
- [88]. Hoffman AS, Stayton PS. Conjugates of stimuli-responsive polymers and proteins. Prog Polym Sci 2007 May; 32 (8-9): 922-932.
- [89]. You J, Almeda D, Ye GJC, Auguste DT. Bioresponsive matrices in drug delivery. J Biol Eng 2010 Nov; 4 (15): 1-12.
- [90]. Patel GC, Dalwadi CA. Recent Patents on Stimuli Responsive Hydrogels Drug Delivery Systems. Recent Pat Drug Deliv Formul 2013 Dec; 7 (3): 206-215.
- [91]. Caló E, Khutoryanskiy VV. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. Eur Polym J 2015 Apr; 65: 252-267.
- [92]. Sandri G, Bonferoni MC, Chetoni P, Rossi S, Ferrari F, Ronchi C, et al. Ophthalmic delivery systems based on drug-polymer-polymer ionic ternary interaction: *in vitro* and *in vivo* characterization. Eur J Pharm Biopharm 2006 Jan; 62 (1): 59-69.
- [93]. Sandri G, Bonferoni MC, Rossi S, Ferrari F, Mori M, Fante CD, et al. Thermosensitive eyedrops containing platelet lysate for the treatment of corneal ulcers. Int J Pharm 2012 Apr; 426 (1-2): 1-6.
- [94]. Wilson CG. Topical drug delivery in the eye. Exp Eye Res 2004 Mar; 78 (3): 737-743.
- [95]. Roy I, Gupta MN, Smart polymeric materials: Emerging biochemical applications. Chem Biol 2003 Dec; 10 (12): 1161-1171.
- [96]. Capadona JR, Shanmuganathan K, Tyler DJ, Rowan SJ, Weder C. Stimuli-Responsive Polymer Nanocomposites Inspired by the Sea Cucumber Dermis. Science 2008 Mar; 319 (5868): 1370-1374.
- [97]. Kumar A. Smart Polymeric Biomaterials: where Chemistry & Biology can merge. Disponível em <http://www.iitk.ac.in/directions/dirnet7/PP~ASHOK~FFF.pdf> [acedido em 02/10/2011].
- [98]. Ruel-Gariépy E, Leroux J. *In situ*-forming hydrogels-review of temperature-sensitive systems. Eur J Pharm Biopharm 2004 May; 58 (2): 409-426.

- [99]. Almeida H, Amaral MH, Lobão P, Frigerio C, Sousa Lobo JM. The Use of Nanoparticles in Ocular Drug Delivery Systems: Promises and Challenges. *Curr Pharm Des* 2015 Nov; 21(36):5212-5224.
- [100]. Kopecek J. Polymer chemistry: swell gels. *Nature* 2002 May; 417 (6887): 388-389.
- [101]. Yeo Y, Park K. A new microencapsulation method using an ultrasonic atomizer based on interfacial solvent exchange. *J Control Release* 2004 Dec; 100 (3): 379-388.
- [102]. Kumar A, Srivastata A, Galaev IY, Mattiasson B. Smart polymers: physical forms and bioengineering applications. *Prog Polym Sci* 2007 Jun; 32 (10): 1205-1237.
- [103]. Jeong B, Gutowska A. Lessons from Nature: stimuli-responsive polymers and their biomedical applications. *Trends Biotechnol* 2002 Jul; 20 (7): 305-310.
- [104]. Gupta P, Vermani K, Garg S. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug Discov Today* 2002 May; 7 (10): 569-579.
- [105]. Soppimath KS, Aminabhavi TM, Dave AM, Kumbhar SG, Rudzinski WE. Stimulus-responsive 'smart' hydrogels as novel drug delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm* 2002 Sep; 28 (8): 957-974.
- [106]. Yokoyama M. Gene delivery using temperature-responsive polymeric carriers. *Drug Discov Today* 2002 Apr; 7 (7): 426-432.
- [107]. Gil ES, Hudson SM. Stimuli-responsive polymers and their bioconjugates. *Prog Polym Sci* 2004 Dec; 29 (12): 1173-1222.
- [108]. Al-Tahami K, Singh J. Smart polymer based delivery systems for peptides and proteins. *Recent Pat. Drug Deliv Formul* 2007 Jan; 1 (1): 65-71.
- [109]. Aguilar MR, Elvira C, Gallardo A, Vázquez B, Román JS. Smart Polymers and their applications as biomaterials. *Topics in Tissue Engineering* 2007; 3 (1): 1-27.
- [110]. Kim S, Kim JH, Jeon O, Kwon IC, Park K. Engineered polymers for advanced drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 2009 Mar; 71 (3): 420-430.
- [111]. Stuart MAC, Huck WTS, Genzer J, Müller M, Ober C, Stamm M, et al. Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials. *Nat Mat* 2010 Jan; 9 (2): 101-113.
- [112]. Shaikh RP, Pillay V, Choonara YE, Toit LC, Ndesendo VMK, Bawa P, et al. A Review of Multi-Responsive Membranous Systems for Rate-Modulated Drug Delivery. *AAPS PharmSci* 2010 Mar; 2 (1): 441-459.
- [113]. Grainger ST, El-Sayed MEH. Stimuli-Sensitive Particles for Drug Delivery. In: Jabbari E, Khademhosseini A, editores. *Biologically-responsive Hybrid Biomaterials: A Reference for Material Scientists and Bioengineers*. Danvers: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.; 2010.
- [114]. Kuckling D, Urban MW. *Handbook of Stimuli-Responsive Materials*. 1<sup>a</sup> ed. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2011.

- [115]. Kumar R, Nagarwal RC, Dhanawat M, Pandit JK. *In-vitro* and *in-vivo* study of indomethacin loaded gelatin nanoparticles. J Biomed Nanotechnol 2011 Jun; 7 (3): 325-333.
- [116]. Mahajan A, Aggarwal G. Smart Polymers: Innovations in Novel Drug Delivery. Int J Drug Dev Res 2011 Jul-Sep; 3 (3): 16-30.
- [117]. Almeida H, Amaral MH, Lobão P. Temperature and pH stimuli-responsive polymers and their applications in controlled and self-regulated drug delivery. J App Pharm Sci 2012 Jun; 2 (6): 01-10.
- [118]. Le Cerf D. Systèmes polymères stimuli sensibles. Ann Pharm Fr 2014 Nov; 72 (6): 389-399.
- [119]. James HP, John R, Alex A, Anoop KR. Smart polymers for the controlled delivery of drugs - a concise overview. Acta Pharm Sin B 2014 Apr; 4 (2): 120-127.
- [120]. Fogueri LR, Singh S. Smart Polymers for Controlled Delivery of Proteins and Peptides: A Review of Patents. Recent Pat Drug Deliv Formul 2009 Jan; 3 (1): 40-48.
- [121]. Kulkarni SS, Aloorkar NH. Smart Polymers in drug delivery: An overview. J Pharm Res 2010 Jan; 3 (1): 100-108.
- [122]. Jones DS. Dynamic mechanical analysis of polymeric systems of pharmaceutical and biomedical significance. Int J Pharm 1999 Mar; 179 (2):167-178.
- [123]. Oh Y, Senter PD, Song S. Intelligent Drug Delivery Systems. Bioconjugate Chem 2009 Jul; 20 (10): 1813-1815.
- [124]. Vodithala S, Khatry S, Shastri N, Sadanandam M. Development and evaluation of thermoreversible ocular gels of ketorolac tromethamine. Int J Biopharm 2010 Jan; 1 (1): 39-45.
- [125]. Amos J. Smart Polymers: Hydrogels and Shape Memory Polymers. Disponível em <http://www.pptsearch.net/details-smart-polymers-hydrogels-and-shape-memory-polymers417365.html> [acedido em 02/10/2011].
- [126]. Kopecek J. Hydrogel Biomaterials: A Smart Future? Biomaterials 2007 Dec; 28 (34): 5185-5192.
- [127]. Matanović MR, Kristl J, Grabnar PA. Thermoresponsive polymers: Insights into decisive hydrogel characteristics, mechanisms of gelation, and promising biomedical applications. Int J Pharm 2014 Sep; 472 (1-2): 262-275.
- [128]. Miyazaki S, Suzuki S, Kawasaki N, Endo K, Takahashi A, Attwood D. *In situ* gelling xyloglucan formulations for sustained release ocular delivery of pilocarpine hydrochloride. Int J Pharm 2001 Oct; 229 (1-2): 29-36.

- [129]. Dilbaghi N, Kaur H, Ahuja M, Kumar S. Evaluation of tropicamide-loaded tamarind seed xyloglucan nanoaggregates for ophthalmic delivery. *Carbohydr Polym* 2013 Apr; 94 (1): 286-291.
- [130]. Rokhade AP, Shelke NB, Patil SA, Aminabhavi TM. Novel hydrogel microspheres of chitosan and pluronic F-127 for controlled release of 5-fluorouracil. *J Microencapsul* 2007 May; 24 (3): 274-288.
- [131]. MacEwan SR, Callahan DJ, Chilkoti A. Stimulus-responsive macromolecules and nanoparticles for cancer drug delivery. *Nanomedicine (London)* 2010 Jul; 5 (5): 793-806.
- [132]. Sawant RM, Hurley JP, Salmaso S, Kale A, Tolcheva E, Levchenko TS et al. "Smart" drug delivery systems: double-targeted pH-responsive pharmaceutical nanocarriers. *Bioconjugate Chem* 2006 Jun-Aug; 17 (4): 943-949.
- [133]. Hsiue GH, Hsu SH, Yang CC, Lee SH, Yang IK. Preparation of controlled release ophthalmic drops, for glaucoma therapy using thermosensitive poly-N-isopropylacrylamide. *Biomaterials* 2002 Jan; 23 (2): 457-462.
- [134]. Escobar-Chávez JJ, López-Cervantes M, Naik A, Kalia YN, Quintanar-Guerrero D, Ganem-Quintanar A. Applications of thermo-reversible Pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *J Pharm Pharm Sci* 2006 Nov; 9 (3): 339-358.
- [135]. Shenoy D, Little S, Langer R, Amiji M. Poly(ethylene oxide)-modified poly( $\beta$ -amino ester) nanoparticles as a pH-sensitive system for tumor-targeted delivery of hydrophobic drugs: *in vitro* evaluations. *Mol Pharm* 2005 Sep-Oct; 2 (5): 357-366.
- [136]. Wu C, Qi H, Chen W, Huang C, Su C, Li W, et al. Preparation and evaluation of a Carbopol/HPMC-based *in situ* gelling ophthalmic system for puerarin. *Yakugaku Zasshi* 2007 Jan; 127 (1): 183-191.
- [137]. Rupenthal ID, Green CR, Alany RG. Comparison of ion-activated *in situ* gelling systems for ocular drug delivery. Part 1: Physicochemical characterisation and *in vitro* release. *Int J Pharm* 2011 Jun; 411 (1-2): 69-77.
- [138]. Tayel SA, El-Nabarawi MA, Tadros MI, Abd-Elsalam WH. Promising ion-sensitive *in situ* ocular nanoemulsion gels of terbinafine hydrochloride: Design, *in vitro* characterization and *in vivo* estimation of the ocular irritation and drug pharmacokinetics in the aqueous humor of rabbits. *Int J Pharm* 2013 Feb; 443 (1-2): 293-305.
- [139]. Yu S, Wang Q, Wang X, Liu D, Zhang W, Ye T, et al. Liposome incorporated ion sensitive *in situ* gels for ophthalmic delivery of timolol maleate. *Int J Pharm* 2015 Mar; 480 (1-2): 128-136.
- [140]. Rozier A, Mazuel C, Grove J, Plazonnet B. Gelrite®: A novel, ion-activated. *in situ* gelling polymer for ophthalmic vehicles. Effect on bioavailability of timolol. *Int J Pharm* 1989 Dec; 57 (2): 163-168.

- [141]. Paulsson M, Hägerström H, Edsman K. Rheological studies of the gelation of deacetylated gellan gum (Gelrite®) in physiological conditions. *Eur J Pharm Sci* 1999 Oct; 9 (1): 99-105.
- [142]. Dickstein K, Hapnes R, Aarsland T. Comparison of Aqueous and Gellan Ophthalmic Timolol With Placebo on the 24-hour Heart Rate Response in Patients on Treatment for Glaucoma. *Am J Ophthalmol* 2001 Nov; 132 (5): 626-632.
- [143]. Carlfors J, Edsman K, Petersson R, Jörnving K. Rheological evaluation of Gelrite® *in situ* gels for ophthalmic use. *Eur J Pharm Sci* 1998 Apr; 6 (2): 105-112.
- [144]. Trinquand C, Romanet JP, Nordmann JP, Dascotte JC, George JL, Lesure P, et al. Efficacite et tolerance du carteolol 1% liberation prolongee une fois par jour. *J Fr Ophthalmol* 2003 Feb; 26 (2): 131-136.
- [145]. Ahuja N, Saini V, Bishnoi VK, Garg A, Hisoria M, Sharma J. Formulation and evaluation of diclofenac sodium gel by using natural polymer. *Rasayan J Chem* 2008 Jul-Sep; 1 (3): 564-566.
- [146]. Cabana A, Ait-Kadi A, Juhász J. Study of the gelation process of polyethylene oxide<sub>a</sub> - polypropylene oxide<sub>b</sub> - polyethylene oxide<sub>a</sub> copolymer (poloxamer 407) aqueous solutions. *J Colloid Interface Sci* 1997 Jun; 190 (2): 307-312.
- [147]. Veyries ML, Couarruze G, Geiger S, Agnely F, Massias L, Kunzli B, et al. Controlled release of vancomycin from poloxamer 407 gels. *Int J Pharm* 1999 Dec; 192 (2): 183-193.
- [148]. Lin HR, Sung KC, Vong WJ. *In situ* gelling of alginate/pluronic solutions for ophthalmic delivery of pilocarpine. *Biomacromolecules* 2004 Nov-Dec; 5 (6): 2358-2365.
- [149]. Chang JY, Oh YK, Choi HG, Kim YB, Kim CK. Rheological evaluation of thermosensitive and mucoadhesive vaginals gels in physiological conditions. *Int J Pharm* 2002 Jul; 241 (1): 155-163.
- [150]. Chang JY, Oh YK, Kong HS, Kim EJ, Jang DD, Nam KT, et al. Prolonged antifungal effects of clotrimazole-containing mucoadhesive thermosensitive gels on vaginitis. *J Control Release* 2002 Jul; 82 (1): 39-50.
- [151]. Ricci EJ, Lunardi LO, Nanclares DMA, Marchetti JM. Sustained release of lidocaine from Poloxamer 407 gels. *Int J Pharm* 2005 Jan; 288 (2): 235-244.
- [152]. Li G, Li M. Preparation and evaluation of ophthalmic thermosensitive *in situ* gels of penciclovir. *J Chinese Pharm Sci* 2007 Jun; 16 (2): 90-95.
- [153]. Qi H, Chen W, Huang C, Li L, Chen C, Li W, et al. Development of a poloxamer analogs/carbopol-based *in situ* gelling and mucoadhesive ophthalmic delivery system for puerarin. *Int J Pharm* 2007 Jun; 337 (1-2): 178-187.

- [154]. Shelke NB, Aminabhavi TM. Synthesis and characterization of novel poly (sebacic anhydride-co-Pluronic F68/F127) biopolymeric microspheres for the controlled release of nifedipine. *Int J Pharm* 2007 Dec; 345 (1-2): 51-58.
- [155]. El-Bagory IM, Bayomi MA, Mahrous GM, Alanazi FK, Alsarra IA. Effect of Gamma Irradiation on Pluronic Gels for Ocular Delivery of Ciprofloxacin: *In Vitro* Evaluation. *Aust J of Basic Appl Sci* 2010 Sep; 4 (9): 4490-4498.
- [156]. Shelke NB, Rokhade AP, Aminabhavi TM. Preparation and Evaluation of Novel Blend Microspheres of Poly(lactic-coglycolic) acid and Pluronic F68/127 for Controlled Release of Repaglinide. *J Appl Polym Sci* 2010 Apr; 160 (1): 366-372.
- [157]. Asasutjarit R, Thanasanchokpibull S, Fuongfuchat A, Veeranondha S. Optimization and Evaluation of thermoresponsive diclofenac sodium ophthalmic *in situ* gel. *Int J Pharm* 2011 Jun; 411 (1-2): 128-135.
- [158]. Almeida H, Amaral MH, Lobão P, Sousa Lobo JM. Pluronic® F-127 and Pluronic Lecithin Organogel (PLO): Main features and their applications in topical and transdermal administration of drugs. *J Pharm Pharm Sci* 2012 Oct; 15 (4): 592-605.
- [159]. Hosseinzadeh H, Ataybi F, Dinarvand R, Ostad SN. Chitosan-Pluronic nanoparticles as oral delivery of anticancer gemcitabine: preparation and *in vitro* study. *Int J Nanomed* 2012 Apr; 7 (1): 1851-1863.
- [160]. Yuan Y, Ying C, Li Z, Hui-ping Z, Yi-Sha G, Bo Z, et al. Thermosensitive and mucoadhesive *in situ* gel based on poloxamer as new carrier for rectal administration of nimesulide. *Int J Pharm* 2012 Jul; 430 (1-2): 114-119.
- [161]. Chen X, Zhi F, Jia X., Zhang X, Ambardekar R, Men Z, et al. Enhanced brain targeting of curcumin by intranasal administration of a thermosensitive poloxamer hydrogel. *J Pharm Pharmacol* 2013 Jun; 65 (6): 807-816.
- [162]. Kurkuri MD, Kulkarni AR, Aminabhavi TM. Rheological investigations on the dispersions of sodium alginate and guar gum mixtures at different temperatures. *Polym Plast Technol Eng* 2002 Feb; 41 (3): 469-488.
- [163]. Ma WD, Xu H, Wang C, Nie SF, Pan WS. Pluronic F 127-g-poly (acrylic acid) copolymers as *in situ* gelling vehicle for ophthalmic drug delivery system. *Int J Pharm* 2008 Feb; 350 (1-2): 247-256.
- [164]. Chen Y, Lu Y, Zhong Y, Wang Q, Wu W, Gao S. Ocular delivery of cyclosporine A based on glyceryl monooleate/poloxamer 407 liquid crystalline nanoparticles: preparation, characterization, *in vitro* corneal penetration and ocular irritation. *J Drug Target* 2012 Dec; 20 (10): 856-863.



- [165]. Desai D, Zia H, Quadir A. Evaluation of selected micronized poloxamers as tablet lubricants. BASF Corporation. Disponível em <http://www.basf.com> [acedido em 08/08/2012]
- [166]. Ruchatz F, Lang S, Reich H. The combination of pluronic F127 and pluronic F68 - a new perspective for thermogelling drug drug delivery formulations. BASF Corporation. Disponível em: <http://www.basf.com> [acedido em 08/08/2012].
- [167]. Schmolka IR. Artificial Skin I. Preparation and properties of Pluronic F-127 gels for treatment of burns. J Biomed Mater Res 1972 Nov; 6 (6): 571-582.
- [168]. Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F, Chaumeil JC. A review of polaxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. Pharm Res 2006 Dec; 23 (12): 2709-2728.
- [169]. Lee SH, Lee JE, Baek WY, Lim JO. Regional delivery of vancomycin using pluronic F-127 to inhibit methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) growth in chronic otitis media *in vitro* and *in vivo*. J Control Release 2004 Apr; 96 (1): 1-7.
- [170]. Ribeiro AM. Preparação, Caracterização e Aplicação de Complexos de Inclusão de Miconazol com Metil- $\beta$ -ciclodextrina: Administração Bucal [Dissertação de Mestrado em Tecnologia Farmacêutica]. Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; 2008.
- [171]. Feng Y, Gordts SC, Chen F, Hu Y, Craeyveld EV, Jacobs F, et al. Topical HDL administration reduces vein graft atherosclerosis in apo E deficient mice. Atherosclerosis 2011 Feb; 214 (2): 271-278.
- [172]. Leszczyńska K, Namiot A, Cruz K, Byfield FJ, Won E, Mendez G, et al. Potential of ceragenin CSA- 13 and its mixture with pluronic F127 as treatment of topical bacterial infections. J Appl Microbiol 2011 Jan; 110 (1): 229-238.
- [173]. Bochot A, Fattal E, Grossiord JL, Puisieux F, Couvreur P. Characterization of a new ocular delivery system based on a dispersion of liposomes in a thermosensitive gel. Int J Pharm 1998 Mar; 162 (1-2): 119-127.
- [174]. Feng S, Huang G. Effects of emulsifiers on the controlled release of Paclitaxel (Taxol®) from nanospheres of biodegradable polymers. J Control Release 2001 Mar; 71 (1): 53-69.
- [175]. Müller-Goymann L, Müller-Goymann CC. Preparation, Characterization, and *In Vitro* Permeation Study of Terbinafine HCl in Poloxamer 407-Based Thermogelling Formulation for Topical Application. AAPS PharmSciTech 2011 Jun; 12 (2): 496-506.
- [176]. Wagh VD, Deshmukh KH, Wagh KV. Formulation and Evaluation of *in situ* Gel Drug Delivery System of *Sesbania grandiflora* Flower Extract for the Treatment of Bacterial Conjunctivitis. J Pharm Sci & Res 2012 Aug; 4 (8): 1880-1884.

- [177]. Gratieri T, Gelfuso GM, Rocha EM, Sarmento VH, Freitas O, Lopez RFV. A poloxamer/chitosan *in situ* forming gel with prolonged retention time for ocular delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 2010 Jun; 75 (2): 186-193.
- [178]. Dumortier G, Grossiod JL, Zuber M, Couarraze G, Chaumeil JC. Rheological study of a thermoreversible morphine gel. *Drug Dev Ind Pharm* 1991 Sep; 17 (9): 1255-1265.
- [179]. Ye F, Yaghmur A, Jensen H, Larsen SW, Larsen C, Østergaard J. Real-time UV imaging of drug diffusion and release from Pluronic F127 hydrogels. *Eur J Pharm Sci* 2011 Jul; 43 (4): 236-243.
- [180]. Pandit NK, Kisaka J. Loss of gelation ability of Pluronic® F127 in the presence of some salts. *Int J Pharm* 1996 Dec; 145 (1-2): 129-136.
- [181]. Pandit NK, Wang D. Salts effects on the diffusion and release rate of propranolol from poloxamer 407 gels. *Int J Pharm* 1998 Jun; 167 (1-2): 183-189.
- [182]. Shin SC, Cho CW, Oh IJ. Effects of non ionic surfactants as permeation enhancers towards piroxicam from the poloxamer gel through rat skins. *Int J Pharm* 2001 Jul; 222 (2): 199-203.
- [183]. Sharma PK, Bhatia SR. Effect of antiinflammatories on pluronic F127: micellar assembly, gelation and partitioning. *Int J Pharm* 2004 Jul; 278 (2): 361-377.
- [184]. Shin SC, Kim J. Enhanced permeation of triamcinolone acetonide through the bucal mucosa. *Eur J Pharm Biopharm* 2000 Sep; 50 (2): 217-220.
- [185]. Shin S, Cho C, Oh I. Enhanced efficacy by percutaneous absorption of piroxicam from the poloxamer gel in rats. *Int J Pharm* 2000 Jan; 193 (2): 213-218.
- [186]. Almeida H, Amaral MH, Lobão P, Sousa Lobo JM. Influence of drug incorporation, temperature and storage time on the pH, textural and rheological properties of different poloxamer hydrogels. *Curr Drug Deliv* 2013 Dec; 10 (6): 753-764.
- [187]. Miyazaki S, Takeuchi S, Yokouchi C, Takada M. PLuronic F-127 gels as a vehicle for topical administration to anticancer agents. *Chem Pharm Bull* 1984 Oct; 32 (10): 4205-4208.
- [188]. Miyazaki S, Tobiyama T, Takada M, Attwood D. Percutaneous Absorption of Indomethacin from Pluronic F-127 Gels in Rats. *J Pharm Pharmacol* 1995 Jun; 47 (6): 455-457.
- [189]. Miyazaki S, Yokouchi C, Nakamura T, Hashiguchi N, Hou W-M, Takada M. Pluronic F-127 gels as a novel vehicle for rectal administration of Indomethacin. *Chem Pharm Bull* 1986 Apr; 34 (4): 1801-1808.
- [190]. DiBiase MD, Rhodes CT. Investigations of epidermal growth factor in semisolid formulations. *Pharm Acta Helv* 1991 Feb; 66 (5-6): 165-169.

- [191]. Jain NK, Shah BK, Taneja LN. Nasal absorption of metoprolol tartrate. Indian J Pharm Sci 1991 Jan-Feb; 53 (1): 16-19.
- [192]. Barichello JM, Morishita M, Takayama K, Nagai T. Absorption of insulin from Pluronic F-127 gels following subcutaneous administration in rats. Int J Pharm 1999 Jul; 184 (2): 189-199.
- [193]. Liaw J, Lin YCh. Evaluation of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) (PEO-PPO-PEO) gels as a release vehicle for percutaneous fentanyl. J Control Rel 2000 Aug; 68 (2): 273-282.
- [194]. Erukova VY, Krylova OO, Antonenko YN, Melik-Nubarov NS. Effect of ethylene oxide and propylene oxide block copolymers on the permeability of bilayer lipid membranes to small solutes including doxorubicin. Biochim Biophys Acta 2000 Sep; 1468 (1-2): 73-86.
- [195]. Lin HR, Sung KC. Carbopol/Pluronic phase change solutions for ophthalmic drug delivery. J Control Release 2000 Dec; 69 (3): 379-388.
- [196]. Wang YY, Hong CT, Chiu WT, Fang JY. *In vitro* and *in vivo* evaluations of topically applied capsaicin and nonivamide from hydrogels. Int J Pharm 2001 Aug; 224 (1-2): 89-104.
- [197]. Fang JY, Leu, YL, Wang YY, Tsai YH. *In vitro* topical application and *in vivo* pharmacodynamic evaluation of nonivamide hydrogels using Wistar rat as an animal model. Eur J Pharm Sci 2002 Jun; 15 (5): 417- 423.
- [198]. Zhang L, Parson DL, Navarre C, Kompella UB. Development and *in-vitro* evaluation of sustained release poloxamer 407 (P 407) gel formulations of ceftiofur. J Control Release 2002 Dec; 85 (1-3): 73-81.
- [199]. Shawesh A, Kallioinen S, Hellen L, Yliruusi J. Pluronic F-127 gels as a vehicle for topical formulations of indomethacin and rheological behaviour of these formulations. Pharmazie 2002 Mar; 57 (3): 186-190.
- [200]. Shin SC, Lee JW, Yang KH, Lee CH. Preparation and evaluation of bioadhesive benzocaine gels for enhanced local anesthetic effects. Int J Pharm 2003 Jul; 260 (1): 77-81.
- [201]. Pillai O, Pachagnula R. Transdermal delivery of insulin from poloxamer gel: *ex vivo* and *in vivo* skin permeation studies in rat using iontophoresis and chemical enhancers. J Control Release 2003 Apr; 89 (1): 127-140.
- [202]. Higashiyama M, Inada K, Ohtori A, Tojo K. Improvement of the ocular bioavailability of timolol by sorbic acid. Int J Pharm 2004 Mar; 272 (1-2): 91-98.
- [203]. Stamatialis DF, Rolevink HHM, Koops GH. Transdermal timolol delivery from a Pluronic gel. J Control Release 2006 Nov; 116 (2): e53-e55.

- [204]. Shin SC, Cho CW. Enhanced transdermal delivery of pranoprofen from the bioadhesive gels. Arch Pharm Res 2006 Oct; 29 (10): 928-933.
- [205]. Qi H, Li L, Huang C, Li W, Wu C. Optimization and Physicochemical Characterization of Thermosensitive Poloxamer Gel Containing Puerarin for Ophthalmic Use. Chem Pharm Bull 2006 Nov; 54 (11): 1500-1507.
- [206]. Varshosaz J, Tabbakhian M, Salmani Z. Designing of a thermoreversible chitosan/poloxamer *in situ* gel for ocular delivery of ciprofloxacin. Open Drug Deliv J 2008 Sep; 2 (1): 61-70.
- [207]. Pandey MS, Belgamwar VS, Surana SJ. Topical Delivery of Flurbiprofen from Pluronic Lecithin Organogel. Indian J Pharm Sci 2009 Jan; 71 (1): 87- 90.
- [208]. Abd-Allah FI, Dawaba HM, Ahmed AM. Preparation, characterization and stability studies of piroxicam-loaded microemulsions in topical formulations. Drug Discov Ther 2010 Aug; 4 (4): 267-275.
- [209]. Zheng X, Wang X, Gou M, Zhang J, Men K, Chen L, et al. A novel transdermal honokiol formulation based on Pluronic F127 copolymer. Drug Deliv 2010 Apr; 17 (3): 138-144.
- [210]. Gupta S, Samanta MK, Raichur AM. Dual-Drug Delivery System Based on *In-Situ* Gel-Forming Nanosuspension of Forskolin to Enhance Antiglaucoma Efficacy. AAPS PharmSciTech 2010 Mar; 11 (1): 322-335.
- [211]. Ammar HO, Salama HA, Ghorab M, Mahmoud AA. Development of dorzolamide hydrochloride *in situ* gel nanoemulsion for ocular delivery. Drug Dev Ind Pharm 2010 Nov; 36 (11): 1330-1339.
- [212]. Chen CC, Fang CL, Al-Suwayeh SA, Leu YL, Fang JY. Transdermal delivery of selegiline from alginate–Pluronic composite thermogels. Int J Pharm 2011 Aug; 415 (1-2): 119-128.
- [213]. Gratieri T, Gelfuso GM, de Freitas O, Rocha EM, Lopez RF. Enhancing and sustaining the topical ocular delivery of fluconazole using chitosan solution and poloxamer/chitosan *in situ* forming gel. Eur J Pharm Biopharm 2011 Oct; 79 (2): 320-327.
- [214]. Chaudhary HR, Brocks DR. The Single Dose Poloxamer 407 Model of Hyperlipidemia; Systemic Effects on Lipids Assessed Using Pharmacokinetic Methods, and its Effects on Adipokines. J Pharm Pharm Sci 2013 Feb; 16 (1): 65-73.
- [215]. Shastri DH, Patel LD, Parikh RK. Studies on *In situ* Hydrogel: A Smart Way for Safe and Sustained Ocular Drug Delivery. J Young Pharm 2010 Apr; 2 (2): 116-120.
- [216]. Shastri DH, Prajapati ST, Patel LD. Thermoreversible mucoadhesive ophthalmic *in situ* hydrogel: Design and optimization using a combination of polymers. Acta Pharm 2010 Sep; 60 (3): 349-360.

- [217]. Darwhekar G, Jain P, Jain DK, Agrawal G. Development and Optimization of Dorzolamide Hydrochloride and Timolol Maleate *in situ* Gel for Glaucoma Treatment. Asian J Pharm Ana 2011 Oct-Dec; 1 (4): 93-97.
- [218]. Gallarate M, Chirio D, Bussano R, Peira E, Battaglia L, Baratta F, et al. Development of O/W nanoemulsions for ophthalmic administration of timolol. Int J Pharm 2013 Jan; 440 (2): 126-134.
- [219]. Wei G, Xu H, Ding PT, Li SM, Zheng JM. Thermosetting gels with modulated gelation temperature for ophthalmic use: the rheological and gamma scintigraphic studies. J Control Release 2002 Sep; 83 (1): 65-74.
- [220]. Mansour M, Mansour S, Mortada ND, Abd Elhady SS. Ocular poloxamer-based ciprofloxacin hydrochloride *in situ* forming gels. Drug Dev Ind Pharm 2008 Jul; 34 (7): 744-752.
- [221]. Mayol L, Quaglia F, Borzacchiello A, Ambrosio L, La Rotonda MI. A novel poloxamers/hyaluronic acid *in situ* forming hydrogel for drug delivery: rheological, mucoadhesive and *in vitro* release properties. Eur J Pharm Biopharm 2008 Sep; 70 (1): 199-206.
- [222]. Mohan EC, Kandukuri JM, Allenki V. Preparation and Evaluation of *In-Situ*-Gels for Ocular Drug Delivery. J Pharm Res 2009 Jun; 2 (6): 1089-1094.
- [223]. He Z, Wang Z, Zhang H, Pan X, Su W, Liang D, et al. Doxycycline and hydroxypropyl-b-cyclodextrin complexin poloxamer thermal sensitive hydrogel for ophthalmic delivery. Acta Pharmaceut Sin B 2011 Dec; 1 (4): 254-260.
- [224]. Bankhele SC, Harale RB, Rao MRP, Dhoka MV. Thermoreversible *In-Situ* Ophthalmic Gelling System of Levofloxacin Hemihydrate: Formulation and Optimization by Factorial Design. Asian J Pharm Res 2012 Jun; 2 (3): 100-106.
- [225]. Lee CH, Moturi V, Lee Y. Thixotropic property in pharmaceutical formulations. J Control Release 2009 Jun; 136 (2): 88-98.
- [226]. Hartmann V, Keipert S. Physico-chemical, *in vitro* and *in vivo* characterization of polymers for ocular use. Pharmazie 2000 Jun; 55 (6): 440-443.
- [227]. Oechsner M, Keipert S. Polyacrylic acid/polyvinylpyrrolidone bipolymeric systems. I. Rheological and mucoadhesive properties of formulations potentially useful for the treatment of dry-eye-syndrome. Eur J Pharm Biopharm 1999 Mar; 47 (2): 113-118.
- [228]. Schoenwald RD, Ward RL, DeSantis LM, Roehrs RE. Influence of high-viscosity vehicles on miotic effect of pilocarpine. J Pharm Sci 1978 Sep; 69 (9): 1280-1283.
- [229]. Kumar S, Himmelstein KJ. Modification of *in situ* gelling behavior of carbopol solutions by hydroxypropyl methyl cellulose. J Pharm Sci 1995 Mar; 84 (3): 344-348.

- [230]. Srividya B, Cardoza RM, Amin PD. Sustained ophthalmic delivery of ofloxacin from a pH triggered *in situ* gelling system. J Control Release 2001 Jun; 73 (2-3): 205-211.
- [231]. Kumar S, Haglund BO, Himmelstein, KJ. *In situ-forming* gels for ophthalmic drug delivery. J Ocul Pharmacol 1995 Jan; 10 (1): 47-56.
- [232]. Wu H, Liu Z, Peng J, Li L, Li N, Li J, et al. Design and evaluation of baicalin-containing *in situ* pH-triggered gelling system for sustained ophthalmic drug delivery. Int J Pharm 2011 May; 410 (1-2): 31-40.
- [233]. Hornof MD, Bernkop-Schnürch A. *In vitro* evaluation of the permeation enhancing effect of polycarbophil-cysteine conjugates on the cornea of rabbits. J Pharm Sci 2002 Dec; 91 (12): 2588-2592.
- [234]. Krenzer KL, Zhang JZ, Coffey MJ, Richardson ME. Safety of repeated topical ocular administration of a polycarbophil-based formulation in several models of ocular surgery in rabbits. J Cataract Refract Surg 2012 Apr; 38 (4): 696-704.
- [235]. Zhu Z, Zhai Y, Zhang N, Leng D, Ding P. The development of polycarbophyl as a bioadhesive material in pharmacy. Asian J Pharm Sci 2013 Aug; 8 (4): 218-227.
- [236]. Shen Y, Ling X, Jiang W, Du S, Lu Y, Tu J. Formulation and evaluation of Cyclosporin A emulgel for ocular delivery. Drug Deliv 2015 Oct; 22 (7): 911-917.
- [237]. Lehr CM, Yong HL, Lee VHL. Improved ocular penetration of gentamicin by mucoadhesive polymer polycarbophil in the pigmented rabbit. Invest Ophthalmol Vis Sci 1994 May; 35 (6): 2809-2814.
- [238]. Durrani AM, Davies NM, Thomas M, Kellaway IW. Pilocarpine bioavailability from a mucoadhesive liposomal ophthalmic drug delivery system. Int J Pharm 1992 Dec; 88 (1-3): 409-415.
- [239]. Nagarsenker MS, Londhe VY, Nadkarni GD. Preparation of liposomal formulation of tropicamide for ocular delivery. Int J Pharm 1999 Nov; 190 (1): 63-71.
- [240]. Gurny R. Preliminary study of prolonged acting drug delivery systems for the treatment of glaucoma. Pharm Acta Helv 1981; 156 (4-5): 130-132.
- [241]. Gurny R, Boye T, Ibrahim H. Ocular therapy with nanoparticulate systems for controlled drug delivery. J Control Release 1985 Nov; 2 (1): 353-361.
- [242]. Sinha VR, Singla AK, Wadhawan S, Kaushik R, Kumria R, Bansal K, et al. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. Int J Pharm 2004 Apr; 274 (1-2): 1-33.
- [243]. de Campos AM, Diebold Y, Carvalho EL, Sanchez A, Alonso MJ. Chitosan nanoparticles as new ocular drug delivery systems: *In vitro* stability, *in vivo* fate, and cellular toxicity. Pharm Res 2004 May; 21 (5): 803-810.

- [244]. Majumdar S, Hippalgaonkar K, Repka MA. Effect of chitosan, benzalkonium chloride and ethylenediaminetetraacetic acid on permeation of acyclovir across isolated rabbit cornea. *Int J Pharm* 2008 Feb; 348 (1-2): 175-178.
- [245]. Yuan XB, Yuan YB, Jiang W, Liu J, Tian EJ, Shun HM, et al. Preparation of rapamycin-loaded chitosan/PLA nanoparticles for immunosuppression in corneal transplantation. *Int J Pharm* 2008 Feb; 349 (1-2): 241-248.
- [246]. Gupta H, Sharma A, Shrivastava B. Pluronic and Chitosan based *In situ* gel system for periodontal application. *Asian J Pharm* 2009 Apr; 3 (2): 94-96.
- [247]. Jain GK, Pathan SA, Akhter S, Jayabalan N, Talegaonkar S, Khar RK, et al. Microscopic and spectroscopic evaluation of novel PLGA-chitosan Nanoplexes as an ocular delivery system. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2011 Feb; 82 (2): 397-403.
- [248]. Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E. Chitosan-A versatile semi synthetic polymer in biomedical applications. *Prog Polym Sci* 2011 Aug; 36 (8): 981-1014.
- [249]. Chockalingam V, Bandaru BR, Senthilkumar K. Babu TA. Chitosan Nanoparticles as Vehicle for Prolonged Ocular Delivery of Ofloxacin. *Pharm Nanotechnol* 2014 Sep; 2 (3): 149-156.
- [250]. Felt O, Furrer P, Mayer JM, Plazonnet B, Buri P, Gurny R. Topical use of chitosan in ophthalmology: tolerance, assessment and evaluation of precorneal retention. *Int J Pharm* 1999 Apr; 180 (2): 185-193.
- [251]. Li J, Xu Z. Physical characterization of a chitosan-based hydrogel delivery system. *J Pharm Sci* 2002 Jul; 91 (7): 1669-1677.
- [252]. Gupta H, Aqil M, Khar RK, Ali A, Bhatnagar A, Mittal G, et al. Development and characterization of Tc-99m timolol maleate for evaluating efficacy of *in situ* ocular drug delivery system. *AAPS Pharm Sci Tech* 2009 Jun; 10 (2): 540-546.
- [253]. Gupta H, Jain S, Mathur R, Mishra P, Mishra AK, Velpandian T. Sustained Ocular Drug Delivery from a Temperature and pH Triggered Novel *In-situ* Gel System. *Drug Deliv* 2007 Nov; 14 (8): 507-515.
- [254]. Gupta S, Vyas SP. Carbopol/chitosan based pH triggered *in situ* gelling system for ocular delivery of timolol maleate. *Sci Pharm* 2010 Dec; 78 (4): 959-976.
- [255]. Yeole PG, Iyer D. Thermosensitive *in situ* gel of Timolol Maleate for the treatment of open angle glaucoma. *Res J Pharm Biol Chem Sci* 2011 Jul-Sep; 2 (3): 1048-1064.
- [256]. Rathman G. Sustained ophthalmic delivery of atenolol for Glaucoma by *in situ* gelling system. *Int J Pharm Res Dev* 2012 Nov; 4 (6): 291-301.
- [257]. Gupta H, Aquil M, Khar RK, Bhatnagar A, Mittal G. An alternative *in situ* gel-formulation of levofloxacin eye drops for prolong ocular retention. *J Pharm Bioallied Sci* 2015 Jan-Mar; 7 (1): 9-14.

- [258]. Almeida AJ, Souto E. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. *Adv Drug Deliv Rev* 2007 Jul; 59 (6): 478-490.
- [259]. Mendes, AIS. Preparação e caracterização de dispersões de nanopartículas lipídicas contendo miconazol. [Tese de Mestrado em Biotecnologia para as Ciências de Saúde]. Vila Real: Universidade de Trás-os Montes e Alto Douro; 2013.
- [260]. Silva AC, Santos D, Ferreira D, Lopes CM. Lipid-based Nanocarriers As An Alternative for Oral Delivery of Poorly Water- Soluble Drugs: Peroral and Mucosal Routes. *Curr Med Chem* 2012 Sep; 19 (26): 4495-4510.
- [261]. Patidar A, Thakr DS, Kumar P, Verma J. A review on novel lipid based nanocarriers. *Int J Pharm Pharm Sci* 2010 Oct; 2 (4): 30-35.
- [262]. Müller RH, Radtke M, Wissing SA. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv Drug Deliv Rev* 2002 Nov; 54: S131–S155.
- [263]. Olbrich C, Scholer N, Tabatt K, Kayser O, Müller RH. Cytotoxicity studies of Dynasan 114 solid lipid nanoparticles (SLN) on RAW 264.7 macrophages-impact of phagocytosis on viability and cytokine production. *J Pharm Pharmacol* 2004 Jul; 56 (7): 883-891.
- [264]. Müller-Goymann CC. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. *Eur J Pharm Biopharm* 2004 Sep; 58 (2): 343-356.
- [265]. Souto EB, Müller RH. Investigation of the factors influencing the incorporation of clotrimazole in SLN and NLC prepared by hot high-pressure homogenization. *J Microencapsul* 2006 Jun; 23 (4): 377-388.
- [266]. Huang ZR, Hua SC, Yang YL, Fang JY. Development and evaluation of lipid nanoparticles for camptothecin delivery: A comparison of solid lipid nanoparticles, nanostructured lipid carriers, and lipid emulsion. *Acta Pharmacol Sin* 2008 Sep; 29 (9): 1094-1102.
- [267]. Sahoo SK, Dilnawaz F, Krishnakumar S. Nanotechnology in ocular drug delivery. *Drug Discov Today* 2008 Feb; 13 (3-4): 144-151.
- [268]. Gokce EH, Sandri G, Bonferoni MC, Rossi S, Ferrari F, Güneri T, et al. Cyclosporine A loaded SLNs: Evaluation of cellular uptake and corneal cytotoxicity. *Int J Pharm* 2008 Nov; 364 (1): 76-86.
- [269]. Doktorovova S, Gokce E, Ozyazici M, Souto EB. Lipid Matrix Nanoparticles. *Pharmacokinetics and Biopharmaceutics. Curr Nanosci* 2009 Aug; 5 (3): 358-371.
- [270]. Souto EB, Müller RH. Lipid nanoparticles: effect on bioavailability and pharmacokinetic changes. *Handb Exp Pharmacol* 2010 Nov; 197: 115-141.



- [271]. Araújo J, Gonzalez-Mira E, Egea MA, Garcia ML, Souto EB. Optimization and physicochemical characterization of a triamcinolone acetonide-loaded NLC for ocular antiangiogenic applications. *Int J Pharm* 2010 Jun; 393 (1-2): 167-175.
- [272]. Souto EB, Doktorovova S, Gonzalez-Mira E, Egea MA, Garcia ML. Feasibility of Lipid Nanoparticles for Ocular Delivery of Anti-inflammatory Drugs. *Curr Eye Res* 2010 Jul; 35 (7): 537-552.
- [273]. Luo Q, Zhao J, Zhang X, Pan W. Nanostructured lipid carrier (NLC) coated with Chitosan Oligosaccharides and its potential use in ocular drug delivery system. *Int J Pharm* 2011 Jan; 403 (1-2): 185-191.
- [274]. Silva AC, Amaral MH, González-Mira E, Santos D, Ferreira D. Solid lipid nanoparticles (SLN)-based hydrogels as potential carriers for oral transmucosal delivery of Risperidone: Preparation and characterization studies. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2012 May; 93: 241-248.
- [275]. Sarmento, BFCC. Improvement of Peptidic Drugs Oral Availability Throught Their Encapsulation In Polyelectrolytes Complexes. [Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas]. Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; 2007.
- [276]. Silva AC, González-Mira E, García ML, Egea MA, Fonseca J, Silva R, et al. Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): High pressure homogenization versus ultrasound. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2011 Aug; 86 (1): 158-165.
- [277]. Silva AC, Santos D, Ferreira D, Souto EB. Advances in Nanoparticulate Carriers for Oral Peptides and Proteins: Polymeric vs. Lipid Nanoparticles. In: Nalwa HS, editor. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*. Los Angeles: American Scientific Publishers; 2010.
- [278]. Shen J, Wang Y, Ping Q, Xiao Y, Huang X. Mucoadhesive effect of thiolated PEG stearate and its modified NLC for ocular drug delivery. *J Control Release* 2009 Aug; 137 (3): 217-223.
- [279]. Gonzalez-Mira E, Egea MA, Garcia ML, Souto EB. Design and ocular tolerance of flurbiprofen loaded ultrasound-engineered NLC. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010 Dec; 81 (2): 412-421.
- [280]. Mehnert W, Mäder K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2001 Apr; 47 (2-3): 165-196.
- [281]. Fangueiro JF, Andreani T, Egea MA, Garcia ML, Souto SB, Silva AM, et al. Design of cationic lipid nanoparticles for ocular delivery: Development, characterization and cytotoxicity. *Int J Pharm* 2014 Jan; 461 (1-2): 64-73.

- [282]. Jores K, Mehnert W, Drechsler M, Bunjes H, Johann C, Mader K. Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field flow fractionation and transmission electron microscopy. *J Control Release* 2004 Mar; 95 (2): 217-227.
- [283]. Souto EB, Doktorovova S. Chapter 6 - Solid Lipid Nanoparticle Formulations: Pharmacokinetic and Biopharmaceutical Aspects in Drug Delivery. *Methods Enzymol* 2009 Dec; 464 (Pt F): 105-129.
- [284]. Müller RH, Maassen S, Weyhers H, Mehnert W. Phagocytic uptake and cytotoxicity of solid lipid nanoparticles (SLN) sterically stabilized with poloxamine 908 and poloxamer 407. *J Drug Target* 1996 Feb; 4 (3): 161-170.
- [285]. Wake MC, Gerecht PD, Lu L, Mikos AG. Effects of biodegradable polymer particles on rat marrow-derived stromal osteoblasts *in vitro*. *Biomaterials* 1998 Jul; 19 (14): 1255-1268.
- [286]. Ravi Kumar MNV. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. *J Pharm Pharm Sci* 2000 May-Aug; 3 (2): 234-258.
- [287]. Kao HJ, Lin HR, Lo YL, Yu SP. Characterization of pilocarpine-loaded chitosan/carbopol nanoparticles. *J Pharm Pharmacol* 2006 Feb; 58 (2): 179-186.
- [288]. Gupta H, Aqil M, Khar RK, Ali A, Bhatnagar A, Mittal G. Sparfloxacin-loaded PLGA nanoparticles for sustained ocular drug delivery. *Nanomedicine* 2010 Apr; 6 (2): 324-333.
- [289]. Gupta H, Aqil M, Khar RK, Ali A, Bhatnagar A, Mittal G. Biodegradable levofloxacin nanoparticles for sustained ocular drug delivery. *J Drug Target* 2011 Jul; 19 (6): 409-417.
- [290]. Li F, Hurley B, Liu Y, Leonard B, Griffith M. Controlled release of bevacizumab through nanospheres for extended treatment of age-related macular degeneration. *Open Ophthalmol J* 2012 Jun; 6: 54-58.
- [291]. Silva AC, González-Mira E, Lobo JM, Amaral MH. Current progresses on nanodelivery systems for the treatment of neuropsychiatric diseases: Alzheimer's and schizophrenia. *Curr Pharm Des* 2013 Dec; 19 (41): 7185-7195.
- [292]. Varshochian R, Jeddi-Tehrani M, Mahmoudi AR, Khoshayand MR, Atyabi F, Sabzevari A, et al. The protective effect of albumin on bevacizumab activity and stability in PLGA nanoparticles intended for retinal and choroidal neovascularization treatments. *Eur J Pharm Sci* 2013 Nov; 50 (3-4): 341-352.
- [293]. Mahmoud AA, El-Feky GS, Kamel R, Awad GEA. Chitosan/sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin nanoparticles as a potential approach for ocular drug delivery. *Int J Pharm* 2011 Jul; 413 (1-2): 229-236.

- [294]. Nagarwal RC, Kumar R, Dhanawat M, Pandit JK. Modified PLA nano *in situ* gel: a potential ophthalmic drug delivery system. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2011 Aug; 86 (1): 28-34.
- [295]. Nagarwal RC, Kumar R, Pandit JK. Chitosan coated sodium alginate-chitosan nanoparticles loaded with 5-FU for ocular delivery: *in vitro* characterization and *in vivo* study in rabbit eye. *Eur J Pharm Sci* 2012 Nov; 47 (4): 678-685.
- [296]. Başaran E, Yenilmez E, Berkman MS, Büyükköroğlu G, Yazan Y. Chitosan nanoparticles for ocular delivery of cyclosporine A. *J Microencapsul* 2014 Feb; 31 (1): 49-57.
- [297]. Silva NC, Silva S, Sarmiento B, Pintado M. Chitosan nanoparticles for daptomycin delivery in ocular treatment of bacterial endophthalmitis. *Drug Deliv* 2015 Oct; 22 (7): 885-893.
- [298]. Calvo P, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Evaluation of cationic polymer-coated nanocapsules as ocular drug carriers. *Int J Pharm* 1997 Jul; 153 (1): 41-50.
- [299]. de Campos AM, Sánchez A, Alonso MJ. Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A. *Int J Pharm* 2001 Aug; 224 (1-2): 159-168.
- [300]. Giannavola C, Bucolo C, Maltese A, Paolino D, Vandelli MA, Puglisi G, et al. Influence of preparation conditions on acyclovir loaded poly-d,l-lactic acid nanospheres and effect of PEG coating on ocular drug bioavailability. *Pharm Res* 2003 Apr; 20 (4): 584-590.
- [301]. Ibrahim HK, El-Leithy IS, Makky AA. Mucoadhesive nanoparticles as carrier systems for prolonged ocular delivery of gatifloxacin/prednisolone bitherapy. *Mol Pharm* 2010 Apr; 7 (2): 576-585.
- [302]. Bhatta RS, Chandasana H, Chhonker YS, Rath C, Kumar D, Mitra K, et al. Mucoadhesive nanoparticles for prolonged ocular delivery of natamycin: *In vitro* and pharmacokinetics studies. *Int J Pharm* 2012 Aug; 432 (1-2): 105-112.
- [303]. Gupta H, Aqil M, Khar RK, Ali A, Bhatnagar A, Mittal G. Nanoparticles laden *in situ* gel for sustained ocular drug delivery. *J Pharm Bioallied Sci* 2013 Apr-Jun; 5 (2): 162-165.
- [304]. Gupta H, Aqil M, Khar RK, Ali A, Bhatnagar A, Mittal G. Nanoparticles laden *in situ* gel of levofloxacin for enhanced ocular retention. *Drug Deliv* 2013 Sep-Oct; 20 (7): 306-309.
- [305]. Jennings V, Gysler A, Schafer-Korting M, Gohla SH. Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin. *Eur J Pharm Biopharm* 2000 May; 49 (3): 211-218.

- [306]. Jennings V, Schafer-Korting M, Gohla S. Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: active release properties. *J Control Release* 2000 May; 66 (2-3): 115-126.
- [307]. Tian BC, Zhang WJ, Xu HM, Hao MX, Liu YB, Yang XG, et al. Further investigation of nanostructured lipid carriers as an ocular delivery system: *In vivo* transcorneal mechanism and *in vitro* release study. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2013 Feb; 102: 251-256.
- [308]. Finke JH, Schmolke H, Klages CP, Müller-Goymann CC. Controlling solid lipid nanoparticle adhesion by polyelectrolyte multilayer surface modifications. *Int J Pharm* 2013 Jun; 449 (1-2): 59-71.
- [309]. Seyfoddin A, Al-Kassas R. Development of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for improving ocular delivery of acyclovir. *Drug Dev Ind Pharm* 2012 Apr; 39 (4): 508-519.
- [310]. Araújo J, Nikolic S, Egea MA, Souto EB, Garcia ML. Nanostructured lipid carriers for triamcinolone acetonide delivery of the posterior segment of the eye. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2011 Nov; 88 (1): 150-157.
- [311]. Attama AA, Reichl S, Müller-Goymann CC. Diclofenac sodium delivery to the eye: *In vitro* evaluation of novel solid lipid nanoparticle formulation using human cornea construct. *Int J Pharm* 2008 May; 355 (1-2): 307-313.
- [312]. Cavalli R, Gasco MR, Chetoni P, Burgalassi S, Saettone MF. Solid lipid nanoparticles (SLN) as ocular delivery system for tobramycin. *Int J Pharm* 2002 May; 238 (1-2): 241-245.
- [313]. Ugazio E, Cavalli R, Gasco MR. Incorporation of cyclosporin A in solid lipid nanoparticles (SLN). *Int J Pharm* 2002 Jul; 241 (2): 341-344.
- [314]. Doktorovova S, Souto EB. Nanostructured lipid carrier-based hydrogel formulations for drug delivery: A comprehensive review. *Expert Opin Drug Deliv* 2009 Feb; 6 (2): 165-175.
- [315]. Kalam MA, Sultana Y, Ali A, Agil M, Mishra AK, Chuttani K. Preparation, characterization, and evaluation of gatifloxacin loaded solid lipid nanoparticles as colloidal ocular drug delivery system. *J Drug Target* 2010 Apr; 18 (3): 191-204.
- [316]. Silva AC, Kumar A, Wild W, Ferreira D, Santos D, Forbes B. Long-term stability, biocompatibility and oral delivery potential of risperidone-loaded solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm* 2012 Oct; 436 (1-2): 798-805.
- [317]. Li X, Nie SF, Kong J, Li N, Ju CY, Pan W. A controlled-release ocular delivery system for ibuprofen based on nanostructured lipid carriers. *Int J Pharm* 2008 Nov; 363 (1-2): 177-182.

- [318]. Müller RH, Mäder K, Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm* 2000 Jul; 50 (1): 161-177.
- [319]. Mendes AI, Silva AC, Catita JAM, Cerqueira F, Gabriel C, Lopes CM. Miconazole-loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for local delivery to the oral mucosa: Improving antifungal activity. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2013 Nov; 111:755-763.
- [320]. Singhal GB, Patel RP, Prajapati BG, Patel NA. Solid lipid nanoparticles and nano lipid carriers: as novel solid lipid based drug carrier. *Inter Res J Pharm* 2011 Feb; 2 (2): 40-52.
- [321]. Chakraborty S, Shukla D, Mishra B, Singh S. Lipid-an emerging platform for oral delivery of drugs with poor bioavailability. *Eur J Pharm Biopharm* 2009 Sep; 73 (1): 1-15.
- [322]. Muchow M, Maincent P, Muller RH. Lipid Nanoparticles with a Solid Matrix (SLN<sup>®</sup>, NLC<sup>®</sup>, LDC<sup>®</sup>) for Oral Drug Delivery. *Drug Dev Ind Pharm* 2008 Dec; 34 (12): 1394-1405.
- [323]. Souto EB, Müller RH. Lipid nanoparticles (solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers) for cosmetic, dermal and transdermal applications. In: Thassu D, Deleers M, Patkak Y, editores. *Nanoparticulate Drug Delivery Systems: Recent Trends and Emerging Technologies*. Nova Iorque: Informa HealthCare; 2007.
- [324]. Souto EB, Müller RH. Lipid nanoparticles (SLN and NLC) for drug delivery. In: Domb AJ, Tabata Y, Ravi Kumar MNV and Farber S, editores. *Nanoparticles for Pharmaceutical Applications*. Califórnia: American Scientific Publishers; 2007.
- [325]. Souto E, Almeida A, Muller R. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) for cutaneous drug delivery: structure, protection and skin effects. *J Biomed Nanotechnol* 2007 Dec; 3 (4): 317-331.
- [326]. Tichota DM. Nanopartículas de lípidos sólidos contendo óleo de Argan. [Projeto II em Tecnologia Farmacêutica]. Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; 2013.
- [327]. Wissing S, Kayser O, Müller R. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv Drug Delivery Rev* 2004 May; 56 (9): 1257-1272.
- [328]. Das S, Chaudhury A. Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. *AAPS PharmSciTech* 2011 Mar; 12 (1): 62-76.
- [329]. Mishra B, Patel BB, Tiwari S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2010 May; 6 (1): 9-24.
- [330]. Vyas SP, Rai S, Paliwal R, Gupta PN, Khatri K, Goyal AK, et al. Solid Lipid Nanoparticles (SLNs) as a Rising Tool in Drug Delivery Science: One Step Up in Nanotechnology. *Curr Nanosci* 2008 Feb; 4 (1): 30-44.

- [331]. Sinha VR, Srivastava S, Goe HI, Jindal V. Solid Lipid Nanoparticles (SLN'S) – Trends and Implications in Drug Targeting. *Int J Adv Pharm Sci* 2011; 1 (3): 212-238.
- [332]. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharmaceut Res* 2002 Jun; 19 (6): 875-880.
- [333]. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Venier-Julienne MC, Proust JE, Phan-Tan-Luu R, et al. The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution. *Eur J Pharm Sci* 2003 Jan; 18 (1): 55-61.
- [334]. Charcosset C, El-Harati A, Fessi H. Preparation of solid lipid nanoparticles using a membrane contactor. *J Control Release* 2005 Nov; 108 (1): 112-120.
- [335]. Ahmed El-Harati A, Charcosset C, Fessi H. Influence of the formulation for solid lipid nanoparticles prepared with a membrane contactor. *Pharm Dev Technol* 2006 May; 11 (2): 153-157.
- [336]. Chattopadhyay P, Shekunov BY, Yim D, Cipolla D, Boyd B, Farr S. Production of solid lipid nanoparticle suspensions using supercritical fluid extraction of emulsions (SFEE) for pulmonary delivery using the AERx system. *Adv Drug Delivery Rev* 2007 Jul; 59 (6): 444-453.
- [337]. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials* 2003 Oct; 24 (23): 4283-4300.
- [338]. Heike B. Structural properties of solid lipid based colloidal drug delivery systems. *Curr. Opin Colloid Interface Sci* 2011 Oct; 16 (5): 405-411.
- [339]. Bunjes H, Westesen K, Koch MHJ. Crystallization tendency and polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles. *Int J Pharm* 1996 Mar; 129 (1-2): 159-173.
- [340]. Schafer-Korting M, Mehnert W, Korting HC. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Adv Drug Deliv Rev* 2007 Jul; 59 (6): 427-443.
- [341]. Li R, Jiang S, Liu D, Bi X, Wang F, Zhang Q, et al. A potential new therapeutic system for glaucoma: solid lipid nanoparticles containing methazolamide. *J Microencapsul* 2011 Mar; 28 (2): 134-141.
- [342]. Liu Z, Zhang X, Wu H, Li J, Shu L, Liu R, et al. Preparation and evaluation of solid lipid nanoparticles of baicalin for ocular drug delivery system *in vitro* and *in vivo*. *Drug Dev Ind Pharm* 2011 Apr; 37 (4): 475-481.
- [343]. Gonzalez-Mira E, Nikolic S, Calpena AC, Egea MA, Souto EB, Souto MI. Improved and safe transcorneal delivery of flurbiprofen by NLC and NLC based hydrogels. *J Pharm Sci* 2012 Feb; 101 (2): 707-725.

- [344]. Hao J, Wang X, Bi Y, Teng Y, Wang J, Li F, et al. Fabrication of a composite system combining solid lipid nanoparticles and thermosensitive hydrogel for challenging ophthalmic drug delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2014 Feb; 114:111-120.
- [345]. Fresta M, Panico AM, Bucolo C, Giannavola C, Puglisi G. Characterization and in-vivo ocular absorption of liposome-encapsulated acyclovir. *J Pharm Pharmacol* 1999 May; 51 (5): 565-567.
- [346]. Fangueiro JF, Andreani T, Egea MA, Garcia ML, Souto SB, Souto EB. Experimental factorial design applied to mucoadhesive lipid nanoparticles via multiple emulsion process. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2012 Dec; 100; 84-89.
- [347]. Almeida H, Amaral MH, Lobão P, Frigerio C, Fonseca J, Silva R, Palmeira-de-Oliveira A, Sousa Lobo JM. New thermoresponsive eyedrop formulation containing ibuprofen loaded-nanostructured lipid carriers (NLC): development, characterization and biocompatibility studies. *Curr Drug Deliv* 2015; In press.
- [348]. Joshi M, Patravale V. Nanostructured lipid carrier (NLC) based gel of celecoxib. *Int J Pharm* 2008 Jan; 346 (1-2): 124-132.
- [349]. Joshi M, Patravale V. Formulation and evaluation of Nanostructured lipid carrier (NLC)-based gel of Valdecoxib. *Drug Dev Ind Pharm* 2006 Sep; 32 (8): 911-918.
- [350]. Casadei MA, Cerreto F, Cesa S, Giannuzzo M, Feeney M, Marianecchi C, et al. Solid lipid nanoparticles incorporated in dextran hydrogels: a new drug delivery system for oral formulations. *Int J Pharm* 2006 Nov; 325 (1-2): 140-146.
- [351]. Teeranachaideekul V, Souto EB, Muller RH, Junyaprasert VB. Physicochemical characterization and *in vitro* release studies of ascorbyl palmitate-loaded semi-solid nanostructured lipid carriers (NLC gels). *J Microencapsul* 2008 Mar; 25 (2): 111-120.
- [352]. Bhaskar K, Krishna MC, Lingam M, Jagan Mohan S, Venkateswarlu V, Madhusudan Rao Y, et al. Development of SLN and NLC enriched hydrogels for transdermal delivery of nitrendipine: *in vitro* and *in vivo* characteristics. *Drug Dev Int Pharm* 2009 Jan; 35 (1): 98-113.
- [353]. Yuan Y, Gao Y, Zhao J, Mao L. Characterization and stability evaluation of  $\beta$ -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions. *Food Res Int* 2008 Jan; 41 (1): 61-68.
- [354]. Bernkop-Schnürch A, Dünnhaupt S. Chitosan-based drug delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm* 2012 Aug; 81 (3): 463-469.
- [355]. Abrego G, Alvarado H, Souto EB, Guevara B, Bellowa LH, Parra A, et al. Biopharmaceutical profile of pranoprofen-loaded PLGA nanoparticles containing hydrogels for ocular administration. *Eur J Pharm Biopharm* 2015 Sep; 95 (Pt B):261-270.

- [356]. Prista LN, Alves AC, Morgado R, Sousa Lobo JM. Tecnologia Farmacêutica. 6<sup>a</sup> ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 2002.
- [357]. Sinko PJ. Martin's Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 6<sup>a</sup> ed. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
- [358]. Wang F, Chen L, Zhang D, Jiang S, Shi K, Huang Y, et al. Methazolamide-loaded solid lipid nanoparticles modified with low-molecular weight chitosan for the treatment of glaucoma: *vitro* and *vivo* study. J Drug Target 2014 Nov; 22(9): 849-858.
- [359]. Kasongo KW, Pardeike J, Müller RH, Walker RB. Selection and characterization of suitable lipid excipients for use in the manufacture of didanosine-loaded solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. J Pharm Sci 2011 Dec; 100 (12): 5185-5196.
- [360]. Liu CH, Wu CT. Optimization of nanostructured lipid carriers for lutein delivery. Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Asp 2010 Jan; 353 (2): 149-156.
- [361]. Martins S, Tho I, Souto E, Ferreira D, Brandl M. Multivariate design for the evaluation of lipid and surfactant composition effect for optimisation of lipid nanoparticles. Eur J Pharm Sci 2012 Apr; 45 (5): 613-623.
- [362]. Harris DC. Análise química quantitativa. 8<sup>a</sup> ed. Nova Iorque: LTC; 2008.
- [363]. ICH Q2 (R1). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. November 2005. Disponível em:  
[http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf) [acedido em 19/08/2015]
- [364]. Hartmann C, Smeyers-Verbeke J, Massart DL, McDowall RD. Validation of bioanalytical chromatographic methods. J Pharm Biomed Anal 1998 Jun; 17 (2): 193-218.
- [365]. Celia C, Trapasso E, Cosco D, Paolino D, Fresta M. Turbiscan lab expert analysis of the stability of ethosomes and ultradeformable liposomes containing a bilayer fluidizing agent. Colloids Surf B Biointerfaces 2009 Aug; 72 (1): 155-160.
- [366]. Fangueiro JF, Andreani T, Fernandes L, Garcia ML, Egea MA, Silva AM, et al. Physicochemical characterization of epigallocatechin gallate lipid nanoparticles (EGCG-LNs) for ocular instillation. Colloids Surf B Biointerfaces 2014 Nov; 123: 452-460.
- [367]. Calvo P, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Effect of lysozyme on the stability of polyester nanocapsules and nanoparticles: stabilization approaches. Biomaterials 1997 Oct; 18 (19): 1305-1310.
- [368]. Gilbert JC, Richardson JL, Davies MC, Palin KJ. The effect of solutes and polymers on the gelation properties of pluronic F-127 solutions for controlled drug delivery. J Control Deliv 1987 Sep; 5 (2): 113-118.



- [369]. Gong C, Shi S, Dong P, Kan B, Gou M, Wang X, et al. Synthesis and characterization of PEG-PCL-PEG thermosensitive hydrogel. *Int J Pharm* 2009 Jan; 365 (1-2): 89-99.
- [370]. Almeida IF, Bahia MF. Evaluation of the physical stability of two oleogels. *Int J Pharm* 2006 Dec; 327 (1): 73-77.
- [371]. das Neves J, Silva MV, Gonçalves MP, Amaral MH, Bahia MF. Rheological Properties of Vaginal Hydrophilic Polymer Gels. *Curr Drug Deliv* 2009 Jan; 6 (1): 83-92.
- [372]. Barnes HA. Thixotropy - A review. *J Non-Newton Fluid Mech* 1997 May; 70 (1-2): 1-33.
- [373]. Rao MA. Rheology of Fluid and Semisolid Foods: Principles and Applications. 2<sup>a</sup> ed. Berlin: Springer; 2007.
- [374]. Oliveira, ÂZM. Desenvolvimento de formulações cosméticas com Ácido Hialurônico. [Dissertação de Mestrado em Tecnologia Farmacêutica]. Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; 2009.
- [375]. Albasini M, Ludwig A. Evaluation of polysaccharides intended for ophthalmic use in ocular dosage forms. *Farmaco* 1995 Sep; 50 (9): 633-642.
- [376]. Nep EI, Conway BR. Grewia Gum 2: Mucoadhesive Properties of Compacts and Gels. *Trop J Pharm Res* 2011 Aug; 10 (4): 393:401.
- [377]. Nho YC, Park JS, Lim YM. Preparation of Poly(acrylic acid) Hydrogel by Radiation Crosslinking and its application for Mucoadhesives. *Polymers* 2014 Mar; 6 (3): 890-898.
- [378]. Thirawong N, Nunthanid J, Puttipipatkachorn S, Sriamornsak P. Mucoadhesive properties of various pectins on gastrointestinal mucosa: An *in vitro* evaluation using texture analyzer. *J Pharm Pharmacol* 2007 Aug; 67 (1): 132-140.
- [379]. Sankar R, Jain SK. Development and characterization of gastroretentive sustained-release formulation by combination of swelling and mucoadhesive approach: a mechanistic study. *Drug Des Devel Ther* 2013 Dec; 7: 1455-1469.
- [380]. Leupke NP, Kemper FH. The HET-CAM Test: An Alternative to the Draize Eye Test. *Food Chem Toxicol* 1986 Jun-Jul; 24 (6-7): 495-496.
- [381]. Gilleron L, Coecke S, Sysmans M, Hansen E, Van Oproy S, Marzin D, et al. Evaluation of a modified HET-CAM assay as a screening test for eye irritancy. *Toxicol In Vitro* 1996 Aug; 10 (4): 431-446.
- [382]. Steiling W, Bracher M, Courtellemont P, de Silva O. The HET-CAM, a Useful *In Vitro* Assay for Assessing the Eye Irritation Properties of Cosmetic Formulations and Ingredients. *Toxicol In Vitro* 1999 Apr; 13 (2): 375-384.
- [383]. Barile FA. Validating and Troubleshooting Ocular *In Vitro* Toxicology Tests. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2010 Mar-Apr; 61 (2): 136-145.

- [384]. Scheel J, Kleber M, Kreutz J, Lehringer E, Mehling A, Reisinger K, et al. Eye irritation potential: Usefulness of the HET-CAM under the Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS). *Regul Toxicol Pharmacol* 2011 Apr; 59 (3): 471-492.
- [385]. ICCVAM-Recommended Test Method Protocol: Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method. Originally published as Appendix B3 of "ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products" NIH Publication No. 10-7553 – Published 2010
- Disponível em: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm> [accedido em 01/05/2015]
- [386]. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. Goodman & Gilman's: as bases farmacológicas da terapêutica. 11<sup>a</sup> ed. Columbus: McGraw-Hill; 2007.
- [387]. Loisa P, Parviainen I, Tenhunen J, Hovilehto S, Ruokonen E. Effect of mode of hydrocortisone administration on glycemic control in patients with septic shock: a prospective randomized trial. *Crit Care* 2007 Feb; 11 (1): R21.
- [388]. Prontuário Terapêutico - 11. Lisboa: Infarmed - Ministério da Saúde; 2013.
- [389]. Connors KA, Amidon GL, Kennon L. Chemical stability of pharmaceuticals: a handbook for pharmacists. 1<sup>a</sup> ed. New York: Wiley; 1979.
- [390]. Gupta VD. Chemical Stability of Hydrocortisone in an Oral Liquid Dosage Form without Suspending Agents. *Int J Pharm Compound* 2007 May-Jun; 11: 259-261.
- [391]. Lenaerts V, Triqueneux C, Querton M, Rieg-Falson F, Couvreur P. Temperature-dependent rheological behavior of Pluronic F-127. *Int J Pharm* 1987 Sep; 39 (1-2): 121-127.
- [392]. Neves AR, Lúcio M, Martins S, Lima JLC, Reis S. Novel resveratrol nanodelivery systems based on lipid nanoparticles to enhance its oral bioavailability. *Int J Nanomedicine* 2013 Jan; 8 (1): 177-187.
- [393]. Wulff-Pérez M, Gálvez-Ruiz MJ, Vicente J, Martín-Rodríguez A. Delaying lipid digestion through steric surfactant Pluronic F68: A novel *in vitro* approach. *Food Res Int* 2010 Jul; 43 (6): 1629-1633.
- [394]. Lamprecht A, Saumet JL, Roux J, Benoit JP. Lipid nanocarriers as drug delivery system for ibuprofen in pain treatment. *Int J Pharm* 2004 Jul; 278 (2): 407-414.
- [395]. Zimmermann E, Souto EB, Müller RH. Physicochemical investigations on the structure of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN) by means of DSC and <sup>1</sup>H NMR. *Pharmazie* 2005 Jul; 60 (7): 508-513.

- [396]. Müller RH, Runge SA, Ravelli V, Thunemann AF, Mehnert W, Souto EB. Cyclosporine-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): drug-lipid physicochemical interactions and characterization of drug incorporation. *Eur J Pharm Biopharm* 2008 Mar; 68 (3): 535-544.
- [397]. Komatsu H, Kitajima A, Okada S. Pharmaceutical characterization of commercially available intravenous fat emulsions: estimation of average particle size, size distribution and surface potential using photon correlation spectroscopy. *Chem Pharm Bull* 1995 Aug; 43 (8): 1412–1415.
- [398]. Bunjes H, Westesen K. Influences of colloidal state on physical properties of solid fats. In: Garti N, Sato K, editores. *Crystallization Processes in Fats and Lipid Systems*. Nova Iorque: Marcel Dekker Inc.; 2001. p. 457-484.
- [399]. Vila A, Sánchez A, Tobío M, Calvo P, Alonso MJ. Design of biodegradable particles for protein delivery. *J Control Release* 2002 Jan; 78 (1-3): 15-24.
- [400]. Peh KK, Khan TA, Ch'ng HS. Mechanical, Bioadhesive Strength and Biological Evaluations of Chitosan films for Wound Dressing. *J Pharm Pharm Sci* 2000 Sep-Dec; 3 (3): 303-311.
- [401]. Almeida H, Amaral MH, Lobão P, Frigerio C, Fonseca J, Silva R, Sousa Lobo JM. Preparation, characterization and biocompatibility studies of thermoresponsive eyedrops based on the combination of nanostructured lipid carriers (NLC) and the polymer Pluronic® F-127 for controlled delivery of ibuprofen. *Pharm Dev Technol* 2015; In press.